



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**POKROČILÁ MIKROSKOPIE VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH
SYSTÉMŮ**

ADVANCED MICROSCOPY IN THE RESEARCH OF COLLOIDAL SYSTEMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Stela Pavlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1155/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Stela Pavlíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Pokročilá mikroskopie ve výzkumu koloidních systémů

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na využití fluorescenční korelační spektroskopie ve výzkumu koloidních systémů.
2. Na základě rešerše navrhnout vhodnou kombinaci sond pro techniku dvoubarevné fluorescenční spektroskopie pro stanovení translační difúze micel ve vodném roztoku kationaktivního, anionaktivního a neionogeního tenzidu.
3. Stanovit pomocí dvoubarevné FCS difúzní koeficient micel z vybraných roztoků tenzidů.
4. Zhodnotit vhodnost dvoubarevné FCS jako nástroje pro studium micelárních systémů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Stela Pavlíková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Táto bakalárska práca je zameraná na dvojfarebnú fluorescenčnú kros-korelačnú spektroskopiu. Ako vhodná kombinácia sond pre túto metódu bola navrhnutá kombinácia perylen + nílka červeň, perylen + DiD a DiO + DiD. Na overenie funkčnosti FCCS boli použité tetraspecky. Samotné meranie bolo prevedené v micelárnych roztokoch tenzidov, ktoré sa však ukázali ako nevhodné pre túto metódu. Následne boli pomocou tejto metódy merané lipozomy, ktoré mali v dvojvrstve fosfolipidov zabudované fluorescenčné sondy DiO a DiD. V lipozomoch bola úspešne nameraná kros-korelácia.

Summary

This bachelor thesis is focused on dual-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy. As a suitable combinations of fluorescent dyes were designated this combinations: perylene + nile red, perylene + DiD and DiO + DiD. The functionality of this method was verified by tetraspeck. The experiment of FCCS was performed on micellar surfactants solutions which proved to be unsuitable for this method. Consequently, liposomes with DiD and DiO incorporated in phospholipid bilayer were measured. The cross-correlation in liposomes was successfully measured.

Klíčová slova

fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia, fluorescencia, tenzidy, lipozomy, DiD, DiO, perylen, nílka červeň

Keywords

dual-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy, fluorescence, surfactants, liposomes, DiD, DiO, perylene, nile red

PAVLÍKOVÁ, S. *Pokročilá mikroskopie ve výzkumu koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 47 s. Vedoucí Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho čas, trpezlivosť a odborné vedenie. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Zuzane Adamcovej za pomoc pri príprave lipozómov. Nakoniec chcem poďakovať mojim najbližším, ktorí ma nielen pri písaní tejto práce, ale pri celom mojom štúdiu podporujú.

Obsah

1	Úvod	4
2	Teoretická časť	5
2.1	Luminiscencia	5
2.2	Fotoluminiscencia	5
2.2.1	Franck-Condonov princíp	6
2.3	Nežiarivé deaktivčné procesy	7
2.3.1	Vibračná relaxácia	7
2.3.2	Vnútorná konverzia	7
2.3.3	Medzisystémový prechod	7
2.4	Žiarivé deaktivčné procesy	7
2.4.1	Fluorescencia	7
2.4.2	Fosforescencia	8
2.4.3	Oneskorená fluorescencia	8
2.4.4	Charakteristiky a vlastnosti fluorescencie	8
2.5	Fluorescenčná korelačná spektroskopia	9
2.5.1	Experimentálne usporiadanie	9
2.5.2	Autokorelačná funkcia	10
2.6	Fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia	11
2.6.1	Princíp merania	12
2.6.2	Kros-korelačná funkcia	12
2.6.3	Využitie FCCS	14
2.7	Fluorofory	15
2.7.1	Perylen	15
2.7.2	Nílska červen	15
2.7.3	DiO	16
2.7.4	DiD	16
2.8	Asociatívne (micelárne) koloidy	16
2.8.1	Kritická micelárna koncentrácia	17
2.8.2	Solubilizácia	17
2.8.3	Klasifikácia micelárnych systemov	17
2.8.4	Septonex	18
2.8.5	CTAB	18
2.8.6	SDS	18
2.8.7	Triton X-100	19
2.9	Lipozómy	19
3	Aktuálny stav riešenej problematiky	20
4	Experimentálna časť	23
4.1	Použité chemikálie	23
4.2	Prístroje a zariadenie	24
4.2.1	Microtime 200	24
4.3	Použité programy	25

4.4	Pracovné postupy	25
4.4.1	Príprava zásobných roztokov tensidov	25
4.4.2	Príprava zásobných roztokov fluorescenčných sond	25
4.4.3	Príprava vzoriek tensidov pre meranie	25
4.4.4	Príprava vzoriek fosfolipidov pre meranie	26
4.5	Vlastné meranie	26
5	Výsledky a diskusia	29
5.1	Tetraspecky	29
5.2	Výber kombinácie fluorescenčných sond	30
5.3	Tenzidy	32
5.3.1	Neionogénne tensidy: Triton X-100	32
5.3.2	Katiónaktívne tensidy: CTAB	33
5.3.3	Katiónaktívne tensidy: Septonex	35
5.3.4	Aniónaktívne tensidy: SDS	36
5.4	Fosfolipidy	38
5.4.1	Lecithin	38
5.4.2	POPG	39
6	Záver	41
7	Zoznam použitých skratiek a symbolov	46

1. Úvod

Fluorescencia ako jav bola po prvý krát pozorovaná pred niekoľkými storočiami. Od toho momentu do súčasnosti sa poznatky o fluorescencií značne rozšírili. Vďaka nadobudnutým znalostiam a pokroku techniky našla fluorescenčná spektroskopia široké uplatnenie. Medzi najvýznamnejšie oblasti, v ktorých sa využíva patria analytické metódy, bunecná biológia a molekulárna genetika.

Dôležitým míľnikom na ceste fluorescenčnej spektroskopie sú 70. roky dvadsiateho storočia a rozvoj fluorescenčnej korelačnej spektroskopie (FCS). Pomocou nej je možné sledovať fluktuáciu intenzity fluorescence, ktorá je následne priradená k fyzikálnemu alebo chemickému parametru. Nevyhnutným technickým vybavením pre meranie fluorescenčnej korelačnej spektroskopie je konfokálny mikroskop.

Metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie je na Fakulte chemickej VUT v Brne veľmi využívaná a náš konfokálny mikroskop nám vďaka svojim rozšíreniam umožňuje merať rôzne módy FCS. Jedným z takýchto módov je aj dvojfarebná fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia (FCCS). Pri tejto metóde sa dva druhy molekúl sa označia dvoma farbivami, ktoré sú dostatočne spektrálne vzdialené, pomocou optických prvkov mikroskopu je odlišená ich fluorescence a systém následne vyhodnocuje podobnosť jedného fluorescenčného signálu s druhým v časovom intervale. Vďaka tomu je možné sledovať napríklad vytváranie komplexov dvoch molekúl.

Vzhľadom k tomu, že dvojfarebná fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia u nás na fakulte ešte nebola vyskúšaná, cieľom tejto práce je túto techniku vyskúšať, nájsť vhodnú kombináciu fluorescenčných farbív a optimalizovať podmienky merania. V prvom rade sme ale museli vybrať systém, na ktorom túto techniku vyskúšame. Ideálny systém na overenie a vyskúšanie tejto techniky by bol FCCS štandard, ktorý ma vo svojej ponuke nemecká firma Iba Lifesciences. Bohužiaľ, kvôli finančnej náročnosti tento systém neprichádzal do úvahy. Preto sme sa rozhodli využiť koloidné systémy, najmä roztoky tenzidov, s ktorými sa u nás na fakulte veľa pracuje a pokiaľ by sa technika FCCS ukázala ako vhodná na analýzu takýchto systémov, mala by veľké využitie pri štúdiu interakcií medzi micelami.

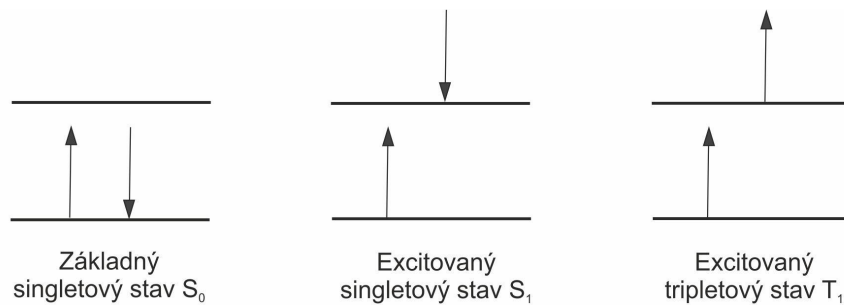
2. Teoretická časť

2.1. Luminiscencia

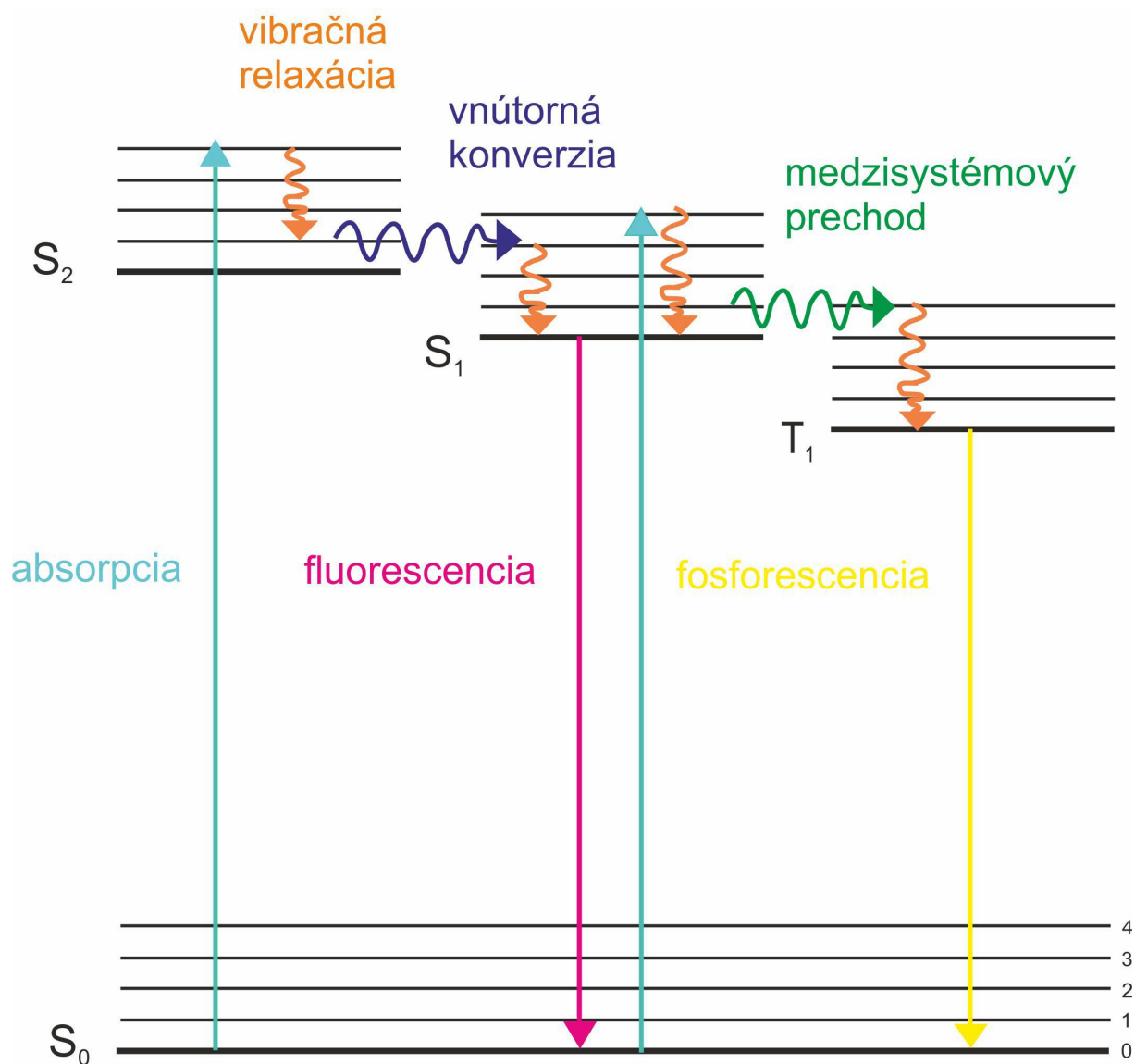
Luminiscencia je spontánna emisia žiarenia, ktorá nastáva z elektronicky excitovaných stavov alebo z vibračne excitovaných stavov, ktoré nie sú v tepelnej rovnováhe s okolím. Excitácia elektrónu do vyšších elektrónových stavov nastať rôznymi mechanizmami, podľa čoho rozpoznávame viacero druhov luminiscencie: *chemiluminiscencia*, ku ktorej dochádza pri chemickej reakcii; zvláštnym prípadom chemiluminiscencie je *bioluminiscencia*, ktorá vzniká chemickou reakciou v živom organizme; *elektroluminiscencia* je vyvolaná elektrickým prúdom; vplyvom elektrochemickej reakcie vzniká *galvanoluminiscencia*; mechanickou energiou je vybudená *mechanoluminiscencia*; vplyvom ultrazvuku vzniká *sonoluminiscencia*; *triboluminiscencia* je vybudená trením a pod. Emisia žiarenia, ktorá vzniká absorpciou fotónov sa nazýva *fotoluminiscencia*. K fotoluminiscencií dochádza vplyvom absorpcie žiarenia, ktoré má vhodnú vlnovú dĺžku na excitáciu molekuly, použité žiarenie býva ultrafialové žiarenie, viditeľné svetlo alebo infračervené žiarenie [1]. Fotoluminiscencia sa v závislosti na povahe excitovaného stavu delí na fluorescenciu, fosforescenciu a oneskorenú fluorescenciu [2].

2.2. Fotoluminiscencia

Excitovať elektromagnetickým žiarením o vhodnej vlnovej dĺžke ide najmä molekuly látok so systémom konjugovaných dvojných väzieb, aromatické zlúčeniny, heterocyklické zlúčeniny alebo organokovové zlúčeniny [3]. Molekuly sa v základnom stave vyskytujú v energeticky najnižšom stave s elektrónom lokalizovaným na základnej singletovej hladine S_0 . Po absorpcii svetla prejde elektrón zo základnej stavu do energeticky vyššieho stavu, pričom absorbovaná energia musí odpovedať energetickému rozdielu základného a výsledného stavu. Z kvantovo-mechanického hľadiska je najpravdepodobnejší vyšší singletový stav S_1 , kedy elektrón nezmení svoj spin a teda spiny dvojice elektrónov sú antiparalelné. V prípade, že spiny dvojice elektrónov sú paralelné, elektrón prešiel do tripletového stavu T_1 . Všetky spomínané hladiny a príslušné spiny sú vyobrazené na obrázku 1. Z excitovaného stavu sa môže elektrón dostať na základnú singletovú hladinu pomocou deaktivčných procesov, ktoré môžu byť buď žiarivé alebo nežiarivé [3][4]. Všetky deaktivčné procesy (žiarivé aj nežiarivé) a excitáciu molekuly znázorňuje Jablonského diagram.



Obrázok 1: Rozdiel medzi základným singletovým, excitovaným singletových a excitovaným tripletovým stavom. Šípky predstavujú orientáciu spinov elektrónov.



Obrázok 2: Jablonskiho diagram - je vyobrazená jedna základná singletová hladina S_0 , dve excitované singletové hladiny S_1 a S_2 a jedna tripletová excitovaná hladina T_1 . Každá z týchto hladín obsahuje ešte veľké množstvo vibračných hladín na ktorých sa môže elektrón nachádzať.

2.2.1. Franck-Condonov princíp

Na obrázku 2 sú okrem singletových a tripletových hladín vyobrazené aj vibračné hladiny. Pri prechode elektrónu medzi elektrónovými stavmi dochádza väčšinou k obsadeniu vyššej vibračnej - rotačnej hladiny. K tomuto javu dochádza preto, lebo pohyb elektrónov je mnohonásobne rýchlejší ako pohyb jadier a teda pri prechode elektrónu zo základného do excitovaného stavu zostane zachovaná pôvodná vzdialenosť medzi jadrami. Táto vzdialenosť však nemusí zodpovedať minimálnej energii molekuly v excitovanom stave a tento stav je termodynamicky nestabilný. Dochádza teda k excitácii elektrónu na takú vibračnú hladinu vyššej elektrónovej hladiny, aby následne došlo k minimálnym zmenám pozície jadier molekuly [5].

2.3. Nežiarivé deaktivčné procesy

2.3.1. Vibračná relaxácia

Elektrón sa po excitácii zvyčajne nachádza na vyššej vibračnej hladine excitovanej energetickej hladiny. Vzhľadom k tomu, že k žiarivému vyžiareniu fotónu väčšinou dochádza z najnižšej vibračnej hladiny elektronického excitovaného stavu, nastáva veľmi rýchly prechod na najnižšiu vibračnú hladinu excitovaného stavu. Tento prechod sa nazýva vibračná relaxácia a molekula pri ňom vyžaruje energiu vo forme tepla.

2.3.2. Vnútoraná konverzia

Vnútoraná konverzia je rýchly prechod medzi najnižšími vibračnými hladinami excitovaného stavu S_1 a najvyššími vibračnými hladinami základného singletového stavu S_0 . K tomuto prechodu môže prísť aj v prípade, že sa tieto hladiny prekrývajú (vtedy elektrón môže prejsť bez toho, aby sa významne zmenila jeho energia) alebo ak sú tieto vibračné hladiny blízko seba.

2.3.3. Medzisystémový prechod

Vibračná relaxácia aj vnútoraná konverzia sú deje, pri ktorých nedochádza k zmene spinovej multiplicity. Do nežiarivých procesov patrí aj medzisystémový prechod, pri ktorom dochádza k zmene multiplicity. Elektrón prechádza zo singletovej hladiny do tripletového stavu s nižšou energiou. Keďže je tento proces spinovo zakázaný, trvá dlhšie ako predchádzajúce dva a je málo pravdepodobný [6][3].

2.4. Žiarivé deaktivčné procesy

2.4.1. Fluorescencia

Návrat z vyššieho singletového stavu na základnú singletovú hladinu za uvoľnenia prebytočnej energie vo forme fotónov sa nazýva fluorescencia. Tento proces je spinovo povolený a pomerne rýchly (približne 10 ns) [4].

Pred emisiou fluorescenčného kvanta dochádza k vibračnej relaxácii a vnútornej konverzií. Tento jav sa nazýva **Kashove pravidlo** a má za následok to, že k fluorescenčnému prechodu dochádza z najnižšej vibračnej hladiny excitovaného singletového stavu S_1 , aj keď po absorpcii žiarenia môže nastať excitácia aj do vyšších vibračných a energetických hladín. Je to spôsobené malým energetickým rozdielom medzi hladinou S_1 a vyššími energetickými hladinami, vďaka ktorému medzi nimi prednostne prebiehajú veľmi rýchle nežiarivé procesy.

Vavilové pravidlo vraví o tom, že kvantový výťažok a doba života excitovaného stavu nezávisí na vlnovej dĺžke žiarenia. Tvar emisného spektra nie je ovplyvnený vlnovou dĺžkou excitácie a na excitáciu sa môže použiť ktorákoľvek vlnová dĺžka z excitačného spektra [2].

2.4.2. Fosforescencia

Pri fosforescencii prechádza elektrón medzisystémovým prechodom z excitovaného singletového stavu S_1 na niektorú z energeticky odpovedajúcich vibračných hladín tripletového stavu T_1 . Pri tomto deji dochádza ku zmene spinu a v dôsledku paralelných spinov je návrat do základného singletového stavu spinovo zakázaný a molekula môže v excitovanom stave zotrvať dlhší čas. Fosforescencia je preto dej pomalší než fluorescencia - doba života fosforescencie je v rozmedzí milisekúnd až sekúnd. V dôsledku konkurenčných nežiarivých procesov býva najčastejšie pozorovaná pri nižších teplotách [4].

2.4.3. Oneskorená fluorescencia

Elektrón po excitácii môže prejsť medzisystémovým prechodom do tripletového stavu z ktorého sa následne opäť vráti do excitovaného singletového stavu a odtiaľ sa žiarivým prechodom dostane naspäť do základného stavu S_0 . Výsledkom je žiarenie, ktoré sa dobou života podobá fosforescencii a emisným spektrom je zhodné s fluorescenciou [1].

2.4.4. Charakteristiky a vlastnosti fluorescencie

Emisné spektrum je závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke pri konštantnej vlnovej dĺžke. Závislosť intenzity fluorescencie na vlnovej dĺžke sa nazýva **excitačné spektrum**. Každé fluoreskujúca zlúčenina má svoje typické a jedinečné fluorescenčné spektrum. Pre veľa fluoreskujúcich molekúl platí pravidlo zrkadlovej symetrie medzi absorpčným a fluorescenčným pásom. Táto symetria je spôsobená tým, že absorpcia aj emisia z odpovedajúcich si vibračných hladín majú rovnakú pravdepodobnosť. Výnimky z pravidla zrkadlovej symetrie sú väčšinou v dôsledku rozdielného geometrického usporiadania atómových jadier v excitovanom stave oproti usporiadaniu v základom stave.

Posun emisného spektra voči excitačnému sa nazýva **Stokesov posun**. Množstvo emitovanej energie je menšie ako množstvo energie absorbovanej, čiže fluorescencia sa vyskytuje pri nižších energiách (dlhších vlnových dĺžkach). Tento jav je spôsobený tým, že časť prijatej energie sa použije na vibračnú relaxáciu [2].

Kvantový výťažok je možno charakterizovať ako počet emitovaných fotónov k počtu fotónov absorbovaných. Je definovaný pomocou nasledujúcej rovnice:

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

Kde ϕ_f je kvantový výťažok, k_r je rýchlostná konštanta značiaca žiarivý prechod a k_{nr} je rýchlostná konštanta zahrňujúca všetky možné nežiarivé prechody. Výsledkom rovnice je teda tá časť fluoroforu, ktorá sa vracia do základného stavu žiarivým prechodom. Z tejto rovnice vyplýva, že pokiaľ bude konštanta žiarivého prechodu omnoho vyššia ako u nežiarivého, kvantový výťažok sa bude blížiť jednej, avšak kvôli Stokesovmu posunu nikdy nebude rovný jednej.

Doba života excitovaného stavu je určená priemerným časom, ktorý molekula strávi v excitovanom stave pred navrátením do základného stavu. Všeobecne je doba života fluorescencie okolo 10 nanosekúnd [4].

Zhasínanie fluorescencie je bimolekulárny proces, ktorý znižuje kvantový výťažok fluorescencie bez zmeny emisného spektra. Môže byť dôsledkom viacerých procesov. Zrážkové zhasínanie nastáva keď je fluorofor v excitovanom stave deaktivovaný, čiže sa

nežiarivo navracia do základného stavu pri zrážke s molekulou zhasáadla. Molekuly nie sú pri tomto procese chemicky zmenené. Pri statickom zhasínaní sa pri zrážke fluoroforu a zhasínadla vytvorí nefluoreskujúci komplex. Samozhasínanie je zhasínanie fluoroforu ním samým, nastáva pri vysokých koncentráciach fluoroforu.

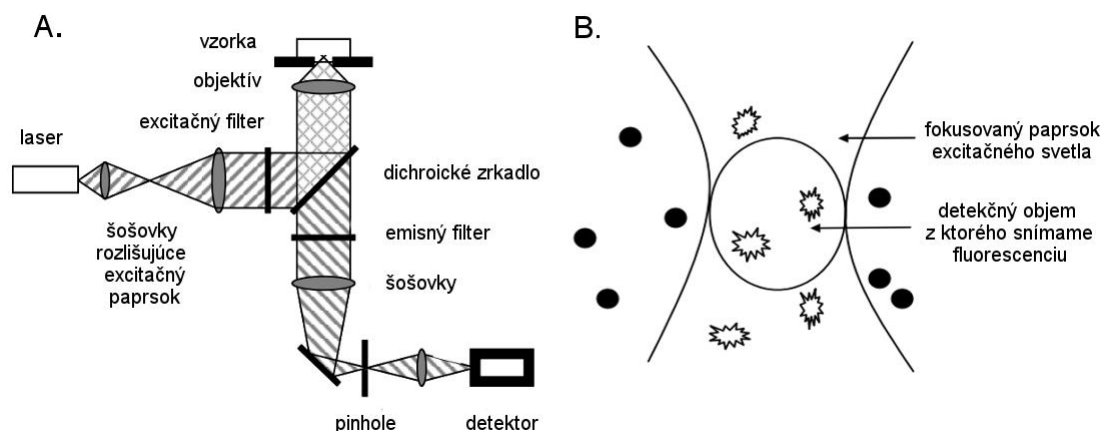
Fotovybielovanie sa od zhasínania líši tým, že pri ňom dochádza k nevratnej deštrukcii excitovaného fluoroforu. Tento jav často obmedzuje možnosť použitia intenzívnejšieho budenia fluorescence [2].

2.5. Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Fluorescenčná korelačná spektroskopia (označovaná ako FCS) je metóda, ktorej princípom je sledovanie časovej fluktuácie intenzity fluorescence pochádzajúcej z malej ohniskovej oblasti konfokálneho mikroskopu. Táto fluktuácia intenzity je výsledkom rôznych dynamických zmien. Najčastejšou zmenou je difúzny pohyb fluoreskujúcich molekúl. Jedna, príp. viac molekúl difundujú cez malý pozorovaný objem ktorý činí 0,3 - 1 femtolitra. Na fluktuácii signálu sa výrazne prejaví ako molekuly prichádzajú do detekčného objemu a ako ho opúšťajú. Zo štatistickej analýzy časovo premenlivého fluorescenčného signálu môže byť okrem difúzneho koeficientu určená doba, ktorú molekula strávi v detekčnom objeme a koncentrácia danej látky. Fluktuácia môže byť okrem difúzie spôsobená rôznymi inými procesmi (chemickou reakciou, fotochemickými procesmi, geometrickou zmenou molekuly, agregacným procesom, apod.) [4] [7].

2.5.1. Experimentálne usporiadanie

Experimentálne zariadenie pre FCS je invertovaný konfokálny fluorescenčný mikroskop. Jeho schému zobrazuje obrázok 3. Používa sa objektív s veľkou numerickou aparaturou, najčastejšie s vodnou imerziou. Malý pozorovaný objem (konfokálny) vzniká fokusáciou laserového paprsku excitovacieho svetla do vzorku. Emitované žiarenie excitovaných molekúl je snímané objektívom a od excitačného žiarenia je oddelené pomocou dichroického zrkadla a emisných filtrov. Do detekčnej časti optickej dráhy je umiestnená konfokálna štrbina (pinhole) o priemere 40 - 100 mikrometrov, ktorá efektívne blokuje svetlo, ktoré pochádza z oblastí mimo ohniskovú rovinu.



Obrázok 3: A. klasické experimentálne usporiadanie pre FCS. B. detekčný objem v ohnisku mikroskopu. [7]

2.5.2. Autokorelačná funkcia

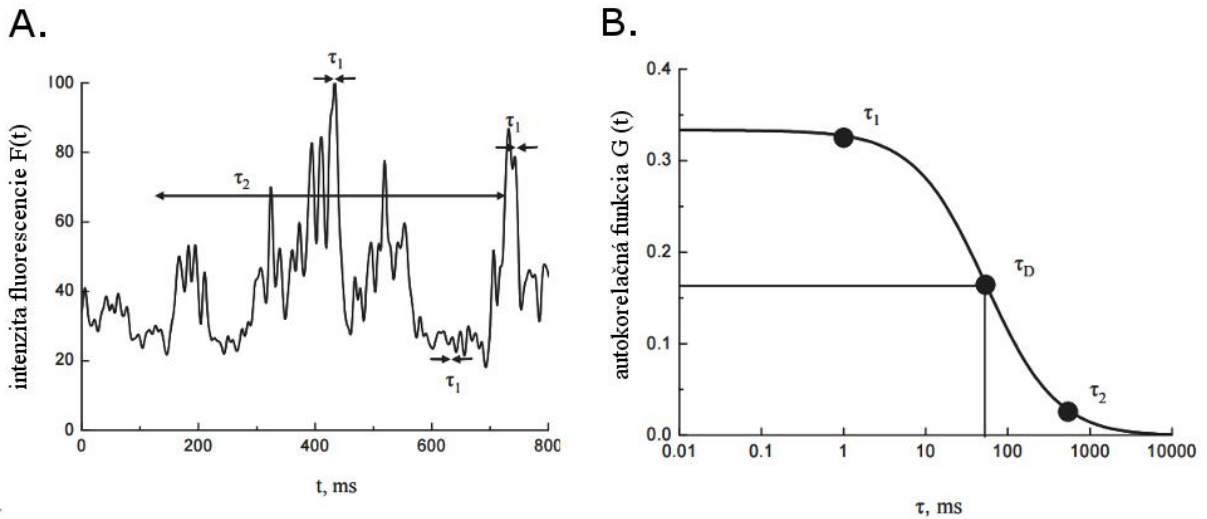
Fluktuácie fluorescenčného signálu $F(t)$, z ktorej môžu byť získané informácie o pohybe jednotlivých molekúl, ktoré sú vo vzorku vo veľmi nízkej koncentrácii (typicky sa pre FCS používajú nanomolárne koncentrácie) je analyzovaná pomocou autokorelačnej funkcie. Pri rovnováhe fluorescencia kolíše okolo strednej hodnoty, pretože jednotlivé molekuly difundujú do a von z pozorovaného objemu. Fluktuácia $\delta F(t)$ intenzity fluorescencie $F(t)$ je definovaná autokorelačnou funkciou

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2)$$

Kde $\langle F(t) \rangle$ značí priemernú hodnotu intenzity fluorescencie v čase a $\delta F(t + \tau)$ odchylku signálu od jeho priemernej hodnoty v časovom intervale $(t + \tau)$, definovanú ako:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3)$$

Autokorelačná funkcia ukazuje súvislosť intenzity fluorescencie s intenzitou fluorescencie po určitom časovom odstupe. Táto funkcia má svoje maximum pre malé časové intervaly τ , pre dlhšie τ klesá k nule. To je spôsobené tým, že v dostatočne malých časových intervaloch τ je vysoko pravdepodobné, že ak na začiatku intervalu bola v detekčnom objeme prítomná molekula, na jeho konci bude ešte stále prítomná. Pokiaľ sa však zvolí dlhší časový interval v detekčnom objeme sa môže vystriedať niekoľko rôznych molekúl a teda intenzita fluorescencie na začiatku časového intervalu nijak nebude súvisieť s intenzitou na konci časového intervalu. Časový interval τ_D pre ktorý má autokorelačná funkcia polovičnú hodnotu než má v svojom maxime potom môžeme považovať za priemernú dobu počas ktorej sa jedna molekula zdržuje v detekčnom objeme. Typický tvar autokorelačnej funkcie znázorňuje obrázok 4 [7].



Obrázok 4: Vytvorenie autokorelačnej funkcie. A. namerané fluktuácie fluorescenčného signálu, B. autokorelačná funkcia a jej hodnoty v krátkych časových intervaloch τ_1 , dlhých časových intervaloch τ_2 a priemerná doba, ktorú strávi molekula v detekčnom objeme τ_D . [7]

Autokorelačná funkcia $G(\tau)$ pre častice pohybujúce sa voľnou difúziou v konfokálnom objeme má tvar Gaussovej krivky:

$$G\tau = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2}}} \quad (4)$$

Kde τ_D je priemerný difúzny čas fluoreskujúcej molekuly, $\langle C \rangle$ je priemerná koncentrácia molekúl v detekčnom objeme, V_{eff} je efektívny objem, z_0 je charakteristický rozmer detekčného objemu v smere optickej osy mikroskopu a r_0 je charakteristický rozmer v ohniskovej rovine.

Efektívny objem je definovaný ako:

$$V_{eff} = \pi \frac{3}{2} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (5)$$

Priemerný difúzny čas, ktorý udáva ako dlho sa zdrží častica v detekčnom objeme je definovaný ako:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (6)$$

Kde D je difúzny koeficient, pomocou ktorého pri známej teplote T a viskozite média η môžeme zo Stokes–Einsteinovej rovnice vypočítať hydrodynamický polomer R_h difundujúcich molekúl:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (7)$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta [8][7].

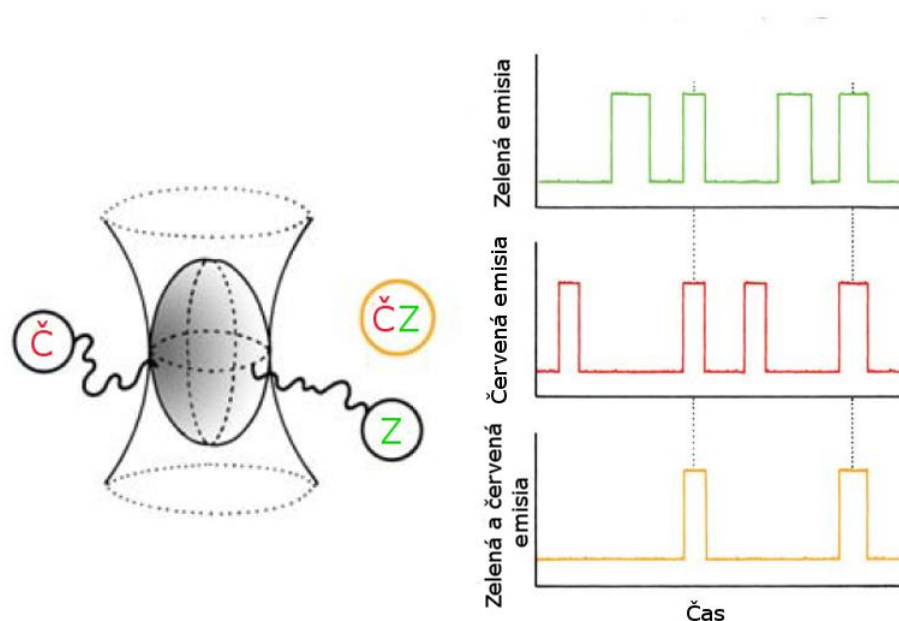
2.6. Fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia

Napriek tomu, že fluorescenčná korelačná spektroskopia je vysoko citlivá metóda so širokým potenciálom využiteľnosti, analyzovať ňou väzbové reakcie je možné len ak pri takejto reakcii dôjde k veľkej zmene molekulovej hmotnosti. V takých prípadoch, kedy k tak veľkej zmene molekulovej hmotnosti nedochádza prichádza na scénu dvojfarebná fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia, tiež označovaná ako FCCS alebo DC-FCCS. Pomocou FCCS je možné paralelne určiť koncentračné a difúzne charakteristiky dvoch rôznych látok [4]. Každá z týchto látok sa označí iným fluorescenčným farbivom. Detekcia fluorescenčného signálu použitých farbív, ktoré musia byť spektrálne dostatočne vzdialené, prebieha separátne na dvoch detektoroch. Kroskorelácia medzi signálom týchto dvoch detektorov vypovedá o vzťahu medzi označenými molekulami. Preto táto metóda našla uplatnenie v systémoch v ktorých dochádza k vzájomnému naviazaniu pozorovaných látok. Najväčší význam má jej použitie v oblasti molekulárnej biológií.

2.6.1. Princíp merania

Pri využití FCCS je dôležité použitie fluorescenčných farbív, ktoré emitujú žiarenie v dostatočne vzdialených vlnových dĺžkach, napríklad zelené a červené farbivo. Na excitáciu takýchto dvoch farbív je nutné použiť dva excitačné zdroje. Tie sú fokusované do toho istého miesta a v ideálnom prípade sa ich ohniská prekrývajú v strede. Avšak každý z nich vytvára iný detekčný objem, čo je spôsobené Abbeho difrakčným limitom a rozdielnym indexom lomu optických komponentov pri rôznych vlnových dĺžkach. Pokiaľ sa však použije vhodná kombinácia fluorescenčných sôd s emisnými spektrami dostatočne oddialenými optickými filtermi, je možné na excitáciu použiť len jeden excitačný zdroj. Rozdielom oproti klasickej FCS je aj použitie detektorov – pre každé farbivo sa využíva samostatný detektor [9].

Pri tejto technike sledovaný systém obsahuje tri druhy častíc. Častice označené zeleným fluorescenčným farbivom (Z), ďalšie častice označené červeným farbivom (C) a tie častice, ktoré vznikli väzbou medzi predchádzajúcimi dvoma a teda sú označené aj zeleným aj červeným (ČZ) farbivom. Po excitácii budú na každom detektore následne pozorované rôzne časové závislosti fluktuácie fluorescencie. Ak fluorofor Z difunduje do detekčného objemu, detektor nastavený na zelenú vlnovú dĺžku zaznamená signál a podobne pre fluorofor C a detektor nastavený na jeho vlnovú dĺžku. Pokiaľ do pozorovaného objemu príde fluorofor ČZ, následne je detekovaný signál na obidvoch detektoroch. To znamená, že do pozorovaného objemu prišla molekula označená obidvoma farbivami, ktorú je možno detegovať kros-koreláciou medzi týmito dvoma kanálmi. Názorne to zobrazuje obrázok číslo 5.



Obrázok 5: Princíp merania dvojfarebnej fluorescenčnej kros-korelačnej spektroskopie [4]

2.6.2. Kros-korelačná funkcia

Ekvivalentne k autokorelačnej funkcii (rovnica 2) pre jedno fluorescenčné farbivo, je definovaná kros-korelačná funkcia $G_{ZC}(\tau)$ pre častice označené dvoma fluorescenčnými farbivami Z a C:

$$G_{zc}(\tau) = \frac{\langle \delta F_c(t) \cdot \delta F_z(t + \tau) \rangle}{\langle F_c(t) \rangle \cdot \langle F_z(t) \rangle} \quad (8)$$

Kde $\langle F_c(t) \rangle$ značí priemernú hodnotu intenzity fluorescencie červeného farbiva v čase, $\langle F_z(t) \rangle$ značí priemernú hodnotu intenzity fluorescencie zeleného farbiva v čase, $\delta F_z(t + \tau)$ a $\delta F_c(t)$ fluktuáciu intenzít v čase t a $(t + \tau)$.

A opäť ekvivalentne k autokorelačnej funkcii, kros-korelačná funkcia $G_{zc}(\tau)$ pre častice pohybujúce sa voľnou difúziou v konfokálnom objeme má tvar Gaussovej krivky:

$$G_{zc}(\tau) = \frac{\langle C_{zc} \rangle}{V_{eff} (\langle C_z \rangle + \langle C_{zc} \rangle) \cdot (\langle C_c \rangle + \langle C_{zc} \rangle)} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2}} \quad (9)$$

Kde $\langle C_c \rangle$, $\langle C_z \rangle$ a $\langle C_{zc} \rangle$ je koncentrácia molekúl označených červeným, zeleným a obidvoma farbivami.

Z rovnice 9 môžeme vidieť, že hodnota kros-korelačnej funkcie v čase $\tau = 0$ je úmerná relatívnej koncentrácii dvojfarebných častíc. Absolútna koncentrácia molekúl označených dvoma farbivami môže potom byť vyjadrená ako:

$$\langle C_{zc} \rangle = \frac{G_{zc}(0)}{V_{eff} (G_c(0) + G_z(0))} \quad (10)$$

Kde $G_z(0)$, resp $G_c(0)$ je hodnota autokorelačných funkcií jednotlivých fluoreskujúcich farbív v čase $\tau = 0$ [8].

Ako je uvedené v kapitole 2.6.1, pri excitácii dvoma excitačnými zdrojmi sa vytvárajú dva rôzne konfokálne objemy.

Pre zelený excitačný zdroj:

$$V_{eff}^z = \pi^{3/2} \cdot r_{0z}^2 z_{0z} \quad (11)$$

Pre červený excitačný zdroj:

$$V_{eff}^c = \pi^{3/2} \cdot r_{0c}^2 z_{0c} \quad (12)$$

Pre kros-korelačné meranie potom efektívny objem upravuje táto rovnica:

$$V_{eff}^{zc} = \frac{\pi^{3/2}}{2^{3/2}} \cdot [(r_{0z}^2 + r_{0c}^2) \cdot (z_{0z}^2 + z_{0c}^2)]^{1/2} \quad (13)$$

Obdobne to vyzerá pre difúzne časy. Pre zelený excitačný zdroj:

$$\tau_D^z = \frac{r_{0z}^2}{4D} \quad (14)$$

Pre červený excitačný zdroj:

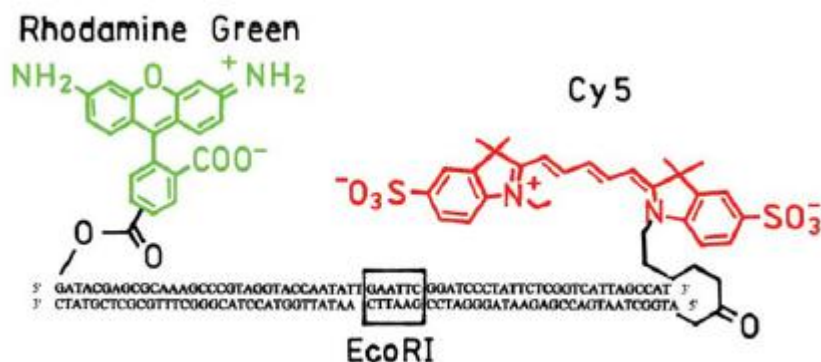
$$\tau_D^c = \frac{r_{0c}^2}{4D} \quad (15)$$

Pre kros-korelačné meranie:

$$\tau_{zc} = \frac{r_{0c}^2 + r_{0z}^2}{8D} \quad (16)$$

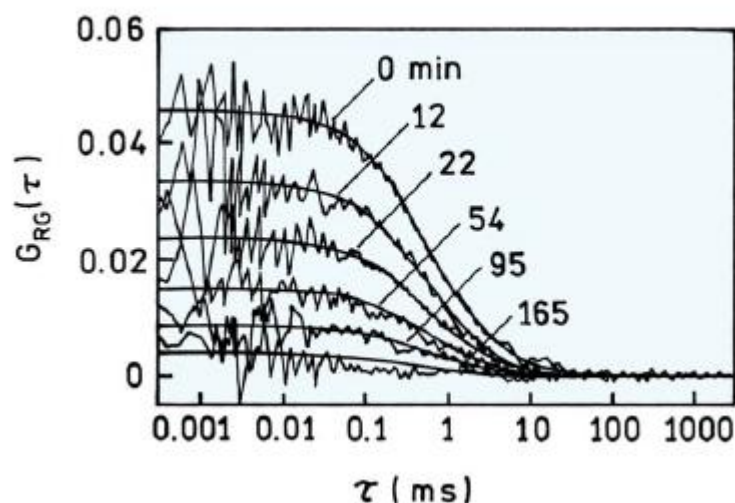
2.6.3. Využitie FCCS

Jedinečnosť informácie, ktorá je poskytovaná FCCS môže byť ilustrovaná na príklade štiepenia oligoméru DNA dlhého 66 bp. Tento oligomér bol značený na obidvoch svojich koncoch – na jednom konci bol značený zeleným fluorescenčným farbivom Rhodamine Green a na druhom konci červeným farbivom Cy-5. Miesto štiepenia pre restričný enzým EcoRI bolo blízko stredu vlákna (obrázok 6).



Obrázok 6: Oligomér DNA s naviazanými fluorescenčnými farbivami a označeným miestom pre štiepenie EcoRI [4]

Kros-korelácia bola meraná v rôznych časových úsekoch od pridania enzýmu EcoRI. Výsledky sú znázornené na obrázku 7. Môžeme z nich vidieť, že pokiaľ DNA nebola rozštiepená EcoRI a farbivá difundovali spoločne naviazané na jednej molekule, kros-korelácia bola vysoká. Ako však s časom dochádzalo k štiepeniu molekúl DNA na dve časti, každá časť s iným farbivom, kros-korelácia sa znižovala až po rozštiepení všetkých molekúl bola takmer nulová. Zvyšková kros-korelácia mohla byť spôsobená cross-talkom medzi detektormi.[4]



Obrázok 7: Kros-korelačná funkcia v čase pre označený oligomer DNA štiepený restričným enzýmom EcoRI[4].

2.7. Fluorofory

Fluorescencie sú schopné najmä molekuly s konjugovaným systémom dvojných väzieb, aromatické zlučeniny a heterocyklické zlúčeniny [3]. Veľká a rôznorodá skupiná fluoreskujúcich látok môže byť rozdelená do 2 hlavných kategórií:

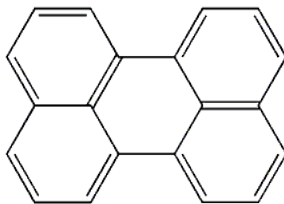
- vnútorné fluorofory,
- vonkajšie fluorofory.

Medzivnútné fluorofory patrí napríklad aromatické aminokyseliny, NADH, flavíny. Vonkajšie fluorofory sú pridávané k látkam, ktoré sami o sebe nefluoreskujú. Prídavkom vonkajšieho fluoroforu do látky vzniká nevlastná fluorescencia [4]. Ak sa po prídavku do vzorku viažu so študovanou látkou kovalentne nazývajú sa fluorescenčnými značkami. Je to napríklad fluoresceinizothiokynát a erytrosin. Fluorescenčné sondy sa viažu k študovnému vzorku nekovalentne a často pri tom menia svoje spektrálne vlastnosti [2].

2.7.1. Perylen

Polycyklický aromatický uhľovodík, ktorý je tvorený dvoma molekulami naftalénu spojenými väzbou uhlík-uhlík medzi 1. a 8. pozíciou (obrázok 8) sa radí medzi membránové lipofilné sondy. Je takmer nerozpustný vo vode, ale dobre rozpustný vo väčšine organických rozpúšťadiel, hlavne v tých nepolárnych ako napríklad chloroform a acetón. Jeho luminiscenčné vlastnosti sú priamo ovplyvňované jeho rozpustnosťou v danom prostredí [10].

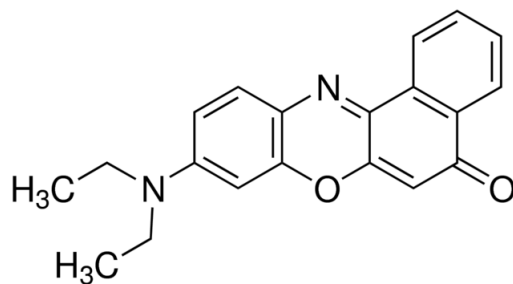
U peryleny platí zákon zrkadlovej symetrie. Aj napriek malému Stokesovmu posunu je perylen a jeho deriváty veľmi obľúbenými fluorescenčnými sondami najmä vďaka jeho schopnosti silno absorbovať UV žiarenie, vysokému kvantovému výťažku a nízkej náchylnosti k fotovybíelovaniu [11].



Obrázok 8: Chemická štruktúra peryleny

2.7.2. Nílska červen

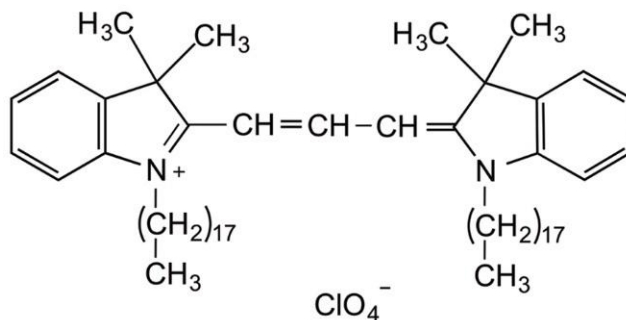
Fenoxazinové fluorescenčné farbivo nílska červen sa využíva na lokalizáciu a kvantifikáciu lipidov, najmä neutrálnych lipidových kvapôčok v bunkách. Vo vode vykazuje len veľmi miernu fluorescenciu, čo je spôsobené tým, že je vo vode takmer nerozpustné. Naopak, v nepolárnom prostredí nastávajú v spektrálnych vlastnostiach tejto sondy veľké zmeny – dochádza k absorpčným a emisným posunom a zvýšeniu intenzity fluorescencie [12]. Charakteristický je pre ňu posun emisie z červenej oblasti do žltej v závislosti na hydrofilných vlastnostiach lipidov. Polárne lipidy v membránach sú vyfarbené červenou, neutrálne žltou [13]. Táto reakcia na prostredie je spôsobená tým, že pri excitácií dochádza k zmene dipólového momentu molekuly [14].



Obrázok 9: Chemická štruktúra Nílskej červen

2.7.3. DiO

Tento lipofilný karbokyanín je slabo fluoreskujúci vo vode. Pokiaľ je však inkorpurovaný do membrán, dáva silný fluorescenčný signál a má vysokú fotostabilitu. Doba života excitovaného stavu v lipidickom prostredí je nízka (približne 1 ns) [15]. Vyexcitovať ho možno vlnovou dĺžkou 484 nm a emisiu poskytuje pri 501 nm.



Obrázok 10: Chemická štruktúra DiO

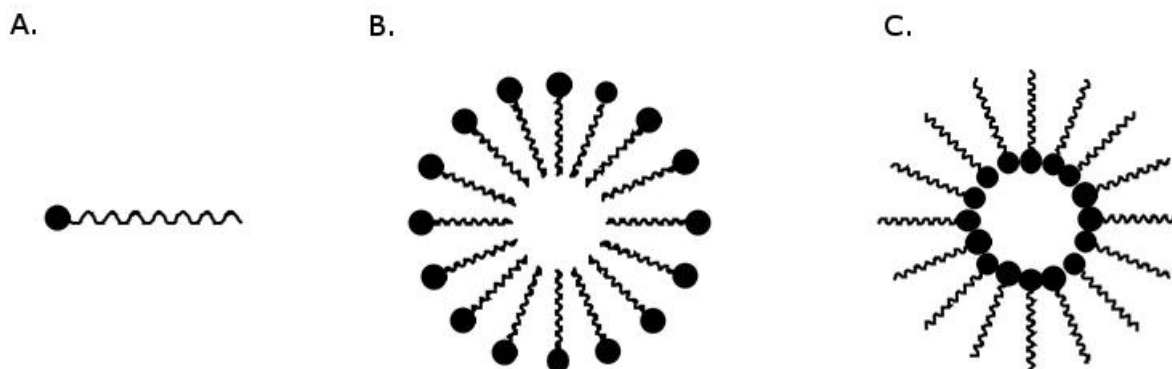
2.7.4. DiD

DiD, rovnako ako DiO patrí do skupiny lipofilných fluorescenčných sond, ktoré sa využívajú na označovanie bunkových membrán a iných hydrofilných štruktúr. Má veľmi podobné spektrálne vlastnosti – vo vode takmer nefluoreskuje, ale dáva silnú fluorescenciu z hydrofilného prostredia. [16] Jeho emitované žiarenie je vo vzdialenej červenej oblasti. Má olejovú konzistenciu pri izbovej teplote. Jeho systematický názov je 1,1'-Dioktadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindodicarbocyanin perchlora [17]. Jeho excitačné maximum je 644 nm a emituje žiarenie o vlnovej dĺžke 663 nm [16].

2.8. Asociatívne (micelárne) koloidy

Koloidne disperzné častice – micely – vznikajú vratnou asociáciou z pravých roztokov niektorých nízkomolekulárnych látok. Tieto koloidné systémy bývajú radené k lyofilným sústavám a od lyofóbných micel sa líšia tým, že nepotrebujú umelú stabilizáciu [18]. Schopnosť vytvárať micely majú len amfifilné molekuly, čiže molekuly, ktoré majú silno hydrofilné polárne skupiny a zároveň dlhý uhlíkový reťazec [20]. Vo väčšine prípadov sa jedná o povrchovo aktívne látky (PAL) rozpustné vo vode.

Vo vodných roztokoch tenzidov vznikajú micely s orientáciou polárnych skupín na stranu vodnej fázy, v roztokoch uhľovodíkov sa vytvárajú micely s opačnou orientáciou molekuly, tzv. obrátené micely [19].



Obrázok 11: *A.* štruktúra tenzidu – amfifilná molekula s hydrofilnou hlavičkou a hydrofilným reťazcom, *B.* priame micely, *C.* obrátené micely.

2.8.1. Kritická micelárna koncentrácia

Vo veľmi zriedených roztokoch tvoria PAL práve roztoky [18]. Koncentrácia PAL po ktorej prekročení začína tvorba micel sa nazýva kritická micelárna koncentrácia (CMC). V blízkosti CMC dochádza na koncentračných závislostiach mnohých fyzikálno-chemických veličín k bodom zlomu, vďaka čomu je možné s veľkou presnosťou určiť hodnoty CMC [19]. Táto hodnota pre rôzne PAL kolíše v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-3} mol·dm⁻³ [18].

2.8.2. Solubilizácia

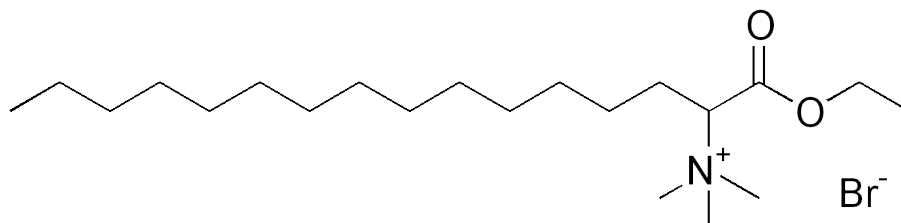
Pridanie tretej látky do sústavy môže v závislosti na jej povahe buď sťažovať vytváranie micel (polárne organické látky) alebo podporovať tento proces (nepolárne uhľovodíky). Pridanie látok podporujúcich vznik micel vedie k určitému zníženiu CMC a pri tom sa podstatne mení štruktúra micel. Pridaná tretia zložka sa stáva súčasťou micely. Následkom toho sa uhľovodíky, ktoré vo vodných roztokoch nie sú rozpustné, rozpúšťajú v micelárnych roztokoch tenzidov. Tento vstup nerozpustnej (resp. slabo rozpustnej) látky do zloženia micel sa nazýva solubilizácia [19].

2.8.3. Klasifikácia micelárnych systemov

Podľa schopnosti disociovať vo vodnom roztoku sú koloidne povrchovo aktívne látky delené na ionogénne (aniónové, kationóvané a amfotérne) a neionogénne. Aniónové PAL disociujú za vzniku povrchovo aktívnych aniónov, kationóvané za vzniku povrchovo aktívnych kationov a pri disociácii amfotérnych micelárnych koloidov náboj závisí na pH roztoku. Neionogénne PAL sú neschopné elektrolytickej disociácie a obvykle sa skladajú dlhého uhlíkového reťazca s niekoľkými polárnymi neionogénnymi skupinami (hydroxylové alebo esterové skupiny) na konci, ktoré zaručujú rozpustnosť týchto zlúčenín. Rozpustnosť PAL vo vode klesá s dĺžkou uhlíkového reťazca [19].

2.8.4. Septonex

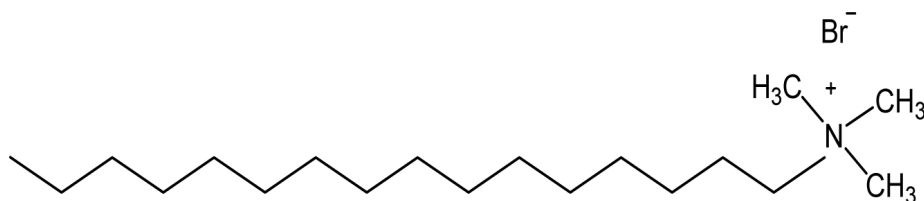
Karbethopendeciniumbromid je biely až svetlo žltý prášok s molekulovou hmotnosťou 422,49 g/mol. Táto látka so systematickým názvom [1-(ethoxykarbonyl)pentadecyl]trimethylamoniumbromid je ľahko rozpustná vo vode, v liehu a v chloroforme. Patrí medzi kationaktívne PAL. Používa sa ako účinná látka mnohých antiseptických a dezinfekčných prípravkov (napr. očné kvapky Ophatalmo-Septonex, nosné kvapky Mukoseptonex apod.) [21]. Jeho štruktúra je zobrazená na obrázku 12. Kritická micelárna koncentrácia je 0,9 M. [22]



Obrázok 12: Chemická štruktúra Septonexu

2.8.5. CTAB

CTAB, systematickým názvom hexadecyltrimethylamonium bromid, je biela prášková látka s molekulovou hmotnosťou 364,5 g/mol. Jej štruktúru znázorňuje obrázok 13. Kritická micelárna koncentrácia tejto kationaktívnej látky vo vode pri 25°C je 1 mM. Agregačné číslo vo vode je 61 a v 13 M roztoku KBr je to 169 [23]. Má baktericídne účinky, pri alkalickom pH je táto látka účinná aj proti gramnegatívnym, aj proti grampozitívnym mikroorganizmom [24]. Používa sa na izoláciu rastlinnej DNA s vysokou molekulovou hmotnosťou [25] a na syntézu zlatých nanočastíc [26]. Na ľudských keratinocytoch a osteoblastoch bolo preukázané, že má nežiadúce účinky na metabolickú aktivitu, proliferáciu a životaschopnosť buniek. Metabolická aktivita sa znižovala so zvýšenou koncentráciou CTAB, pri koncentrácii 1mM CTAB nastala kompletná redukcia metabolickej aktivity. Tieto cytotoxické účinky sa však v prípade nízkej koncentrácie CTAB (0,2mM) dajú zmierniť prídavkom hyaluronanu [27].

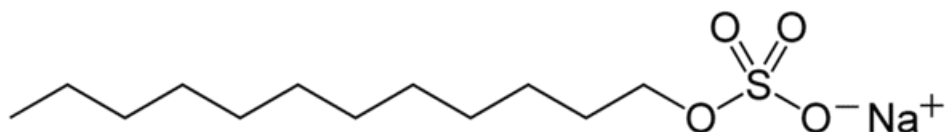


Obrázok 13: Chemická štruktúra CTAB

2.8.6. SDS

Dodecylsulfát sodný je biela až svetložltá kryštalická látka s molekulovou hmotnosťou 288,34 g/mol [28]. Kritická micelárna koncentrácia vo vode pri 25°C je 8,3 mM a agregáčn číslo je 62 [29]. Po chemickej stránke je to zvyčajne zmes sódných alkylsulfátov, najmä laurylsulfátu. Jej štruktúru znázorňuje obrázok 14. SDS veľmi účinne denaturuje proteíny, využíva sa preto najmä pri denaturačnej elektroforéze proteínov v polyakrylamidovom

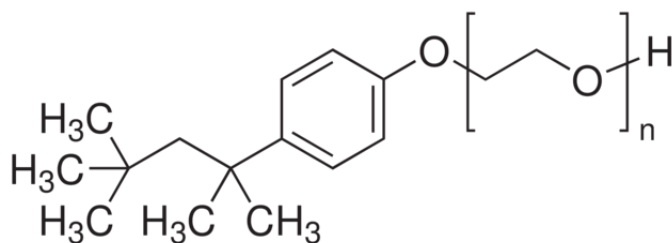
géli (PAGE-SDS), kedy účinkom SDS dochádza k rozpadu kvartérnej štruktúry proteínu na jednotlivé proteinové jednotky, ktoré na seba viažu molekuly SDS v konštantom pomere: 1 g polypeptidu naviaže 1,4 g SDS. Skutočné náboje polypeptidov sa stávajú zanedbateľné s nábojom, ktorý im udelí SDS a teda v polyakrylovom gély migrujú podľa svojej veľkosti [30]. Používa sa taktiež ako emulgátor tukov, zmáčacie činidlo a v rade produktov osobnej hygieny ako napríklad zubné pasty, krémy, pleťové vody, šampóny a podobne [31].



Obrázok 14: Chemická štruktúra SDS

2.8.7. Triton X-100

Systematický názov tohto neionogénneho tenzidu je 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)fenoxy] ethanol. Táto látka s molekulovou hmotnosťou 620 g/mol má kritickú micelárnu koncentráciu vo vode pri 25°C približne 0,2 mM a agregáčnej číslo v rozmedzí 100 - 150 [32]. Táto jasná až mierne zakalená kvapalina bezfarebnej až žltej farby nemá žiadne antimikrobiálne vlastnosti [33]. Je vhodný na izoláciu membránových proteínov, pretože narúša interakcie proteín-lipid aj interakcie lipid-lipid ale interakcie proteínu s proteínom zostanú zachované a nemá ani denaturačné vlastnosti. Proteíny sa preto solubilizujú vo svojej aktívnej a natívnej forme so zachovanými vzájomnými interakciami [34].



Obrázok 15: Chemická štruktúra Triton X-100

2.9. Lipozómy

Lipozómy sú malé umelé sférické štruktúry, ktoré sú zložené z lipidovej dvojvrstvy. Základnou stavebnou zložkou lipozomov sú amfifilné lipidy, napr. cholesterol alebo iné prírodné netoxické fosfolipidy, ktoré v dostatočnej koncentrácii vo vodnom prostredí vytvárajú koloidne váčky, ktoré majú v sebe uzavretú časť vodnej fázy [35]. Vďaka svojej veľkosti, biokompatibilite, hydrofóbnemu a hydrofilnému charakteru sa využívajú ako nosiče v kozmetológii a farmácii. Lipozómové vlastnosti sa líšia v závislosti na zložení lipidov, povrchovom náboji, veľkosti a spôsobe prípravy [36]. Lipidové dvojvrstvy sú vytvarované tak, aby polárne hlavičky lipidov smerovali do vnútornej dutiny a do extravezikulárneho prostredia a hydrofóbne reťazce smerovali k sebe [35].

3. Aktuálny stav riešenej problematiky

Metóda FCCS bola po prvý krát použitá v roku 1997 tímom nemeckých vedcov **Schwille a spol.**, ktorí túto techniku vyskúšali a opísali. Na svoj experiment využili dva oligonukleodity. Jeden označili fluorescenčným farbivom Rhodamine Green a druhý Cy-5. Obidva oligonukleotidy označili na 5'-konci, teda na obidvoch stranách dvojvláknového DNA komplexu. Na excitáciu použili najskôr argónový 488 nm laser, ktorý však dostatočne nevyexcitoval obidve farbivá. Preto následne použili kombináciu laserov kryptón-argónový laser 647 nm a už spomínaný 488 nm laser. Na detektore pre zelené farbivo použili 530/45 bandpass filter a na červenom kanály využili longpass filter 667 nm. Kros-koreláciu sa im podarilo úspešne namerať a vo svojej práci zhrnuli základné teoretické a praktické znalosti k tejto problematike [37].

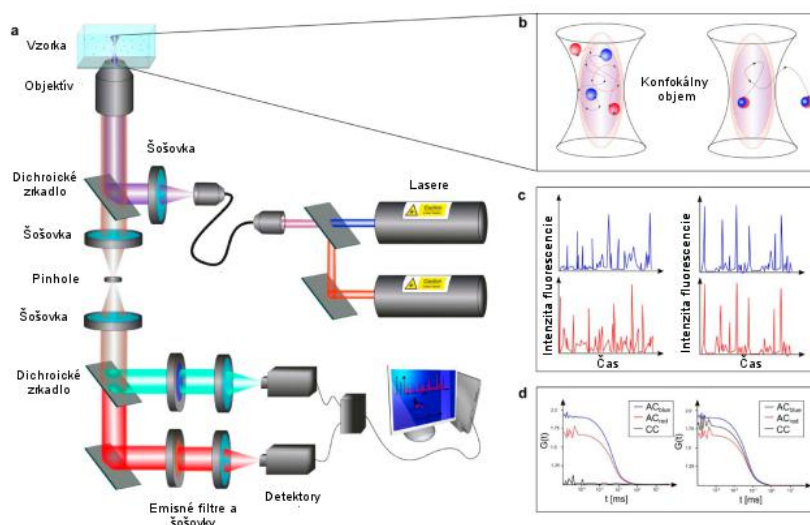
V roku 2013 nemeckí vedci **Simeonov a spol.** využili dvojfarebnú fluorescenčnú kros-korelačnú spektroskopiu na optimalizáciu tvorby proteolipozómov. Najviac používaná metóda na ich tvorbu je v prítomnosti detergentov. Kritickým krokom tejto metódy je odstraňovanie detergentov zo zmesi tak, aby to viedlo k homogénnej zmesi protelipozómov s požadovaným pomerom lipid-proteín a s proteínom funkčne integrovaným do lipozómu. Na optimalizáciu sa používa viacero technik, avšak žiadna z nich nie je ideálna a pri každej sa vyskytuje určitý problém (analýza len solubilizácie lipozómov, nie však zabudovania proteínu, zisk priemerných parametrov vzorky, ktoré neinformujú o možnej nehomogenite...).

Techniku FCCS využili v tomto experimente ako nástroj, ktorý by mohol riešiť tieto problémy. Lipozómy označili červeným fluorescenčným farbivom (DiD-C₁₈), ktoré má absorpčné maximum v lipozómoch 652 nm a emisné maximum 670 nm, a proteín NorA izolovaný z *Staphylococcus aureus* označili zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) s absorpčným maximom v 490 nm a emisným maximom v 670 nm, detergent bol použitý Triton X-100. Použili mikroskop ConfoCor 3/LSM710 s objektívom s vodnou imerziou a s 635 nm dichroickým zrkadlom. Zelené farbivo bolo excitované 488 nm argónovým laserom a jeho signál bol detegovaný na zelenom kanály s bandpass filtrom od 505 nm do 610 nm. Hélium - neónový laser s vlnovou dĺžkou 633 nm excitoval (DiD-C₁₈), na detekciu jeho signálu bol použitý 655 nm longpass filter. Experiment vykonali 4 krát s rôznymi podmienkami. Z autokorelačných a kros-korelačných funkcií bolo určené umiestnenie proteínov a vďaka rozdielnym difúznym charakteristikám boli jednoducho rozlíšené micely, lipozómy a agregáty. Ďalej bola určená veľkosť častíc, počet častíc a frakčná kompozícia. Zabudovanie NorA-GFP do lipozómov bolo optimalizované a FCCS bola vyhodnotená ako veľmi užitočná technika na monitorovanie tvorby proteolipozómov [39].

FCCS bola v roku 2012 nemeckou skupinou vedcov **Schaeffelm a spol.** využitá na štúdium koalescencie a agregácie pri príprave nanočastíc. Polystyrénové nanočastice boli pripravované tromi rôznymi spôsobmi: odparovaním rozpúšťadla z kvapiek emulzie, mikroemulznou polymeráciou a medzifázovou polykondenzáciou alkoxyasilanov s emulznými kvapôčkami ako matricami. Na prípravu boli využité dva polyméry, obidva boli fluorescenčne značené skupinou sond BODIPY – jeden modrou sondou a druhý červenou. Princíp experimentu znázorňuje obrázok 19 a schému experimentu obrázok 20



Obrázok 19: Princíp experimentu. Dva rozdielne fluorescenčne značené polyméry sa rozpustia v organickom rozpúšťadle a pred vzájomným zmiešaním sa dispergujú miešaním a sonifikáciou. Polymerizácia alebo odparenie vedie k tvorbe dispergovaných stabilných častíc. Pomocou FCCS bolo zisťované, či vzniknú častice označené len jednou farbou alebo obidvoma.



Obrázok 20: Schématické znázornenie experimentu. A. Experimentálne usporiadanie. B. Konfokálny objem vytvorený modrým a červeným paprskom a pozorované farbivá difundujúce buď spoločne alebo samostatne. C. Fluktuácia fluorescencie a D. korelačné funkcie vo vzťahu s B.

Pre všetky tri metódy prípravy nanočastíc merali tri vzorky – pozitívnu kontrolu, ktorá bola tvorená dvojfarebnými nanočasticami, negatívnu kontrolnú vzorku, ktorá obsahovala častice dvoch farieb a sledovanú vzorku. V pozitívnych kontrolných vzorkách bola vyhodnotená vysoká kros-korelácia, v negatívnych bola takmer nulová a v skúmaných vzorkách to záviselo od metódy prípravy nanočastíc. Pomocou FCCS detegovali rôznu úroveň koalescencie a vyhodnotili, pre ktoré metódy prípravy koalescencia hrá rolu [40].

Japonskí vedci **Kitamura a spol.** v roku 2016 publikovali svoj experiment v ktorom sa zamerali na výskum amyotrofickéj laterálnej sklerózy (ALS), pri ktorej dochádza k tvorbe inklúzných telies (IB) z nesprávne zložených proteínov v neurónových bunkách. ALS vyvoláva proteín TAR RNA/DNA-väzbový proteín o veľkosti 43 kDa (TDP43). Vzťah medzi lokalizáciou IB a neurotoxicitou zatiaľ nie je objasnený. V tomto experimente analyzovali agregáciu fluorescenčne značeného TDP43 a jeho koncových karboxylových fragmentov (CTF) za pomoci FCS a FCCS. Proteín TDP43 na N-konci označili červeným fluorescenčným proteínom (RFP) a na C-konci zeleným fluorescenčným proteínom (GFP). Na

meranie použili systém ConfoCor 2 s vodnou imerziou a na excitáciu boli použité vlnové dĺžky 488 nm a 543 nm. Po dobu niekoľkých hodín vďaka fluorescenčnému signálu a kroskorelácie sledovali umiestnenie, pohyb a štiepenie N-koncov a C-koncov v bunke [41].

V roku 2013 skupina anglických vedcov **Winzen a spol.** využili metódu FCCS na preukázanie tvorby hybridných polymer-lipidových a polymer-cholesterových vezikúl. Vezikuly vytvárali z poly(dimethylsiloxan)-*blok*-poly(2-methyl-oxazolin) označeného fluorescenčným farbivom Bodipy 500/510 C₁₂-HPC, z 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholín označeného fluorescenčným farbivom Alexa Fluor 647 a TopFluor cholesterolu. Mera-
nie bolo prevedené na invertovanom mikroskope IX70 s konfokálnou laserovou jednotkou FluoView 300 a FCS jednotkou od PicoQuant. Bodipy a TopFluor bolo excitované argónovým laserom o vlnovej dĺžke 488 nm a emisia bola detekovaná bandpass filtrom BP525/50. Alexa Fluor bolo excitované hélium-neónovým laserom o vlnovej dĺžke 633 nm a emisia bola detegovaná longpass filtrom 635 nm. Autokorelačné krivky a kros-korelačná krivka boli vo výsledku takmer totožné, menšie odchýlky vysvetlili malým množstvom voľného difúzneho farbiva alebo tvorbou agregátov. Tvorbu hybridných štruktúr teda potvrdili pomocou FCCS a túto teóriu podporili aj hydrodynamickými polomermi vypočítanými pre rôzne kanály [42].

4. Experimentálna časť

4.1. Použité chemikálie

CTAB	Hexadecyltrimethylamonium bromid, > 99% CAS: 57-09-0 Sigma Aldrich Číslo šarže:SLBJ9504V
Septonex	Karbethopendeciniumbromid CAS: 10567-02-9 GBNchem Číslo šarže: 511SEP003
Triton X-100	Karbethopendeciniumbromid CAS: 10567-02-9 GBNchem Číslo šarže: 511SEP003
SDS	Dodecylsulfát sódný CAS: 25155-30-0 Sigma Aldrich Číslo šarže: BCBP8723V
Tetraspeck	Life technologies Číslo šarže: 1450713
Lecithin	L- α -fosfatidylcholin bromid Egg, Chicken, > 99% CAS: 97281-44-2 Avanti Polar Lipids Číslo šarže: EPC-599
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] (Sodium Salt), >99%, CAS: 268550-95-4 Avanti Polar Lipids
DiD	<i>DiIC</i> ₁₈ (5) solid CAS: 127274-91-3 Life technologies Číslo šarže: 1639153
DiO	3,3'-Dioktadecykloxakarbokyanin perchlorát CAS: 34215-57-1 Sigma Aldrich
Nílska červeň	CAS: 7385-67 3 Sigma Aldrich Číslo šarže: BCBK2559V
Perylen	CAS: 198-55-0 Fluka
Acetón	CAS: 67-64-1 Penta Číslo šarže: 1308200810

Chloroform	CAS: 67-66-3 Penta Číslo šarže: 2097200715
DMSO	Dimethyl sulfoxid CAS: 67-68-5 Fluka Číslo šarže: 1468197V

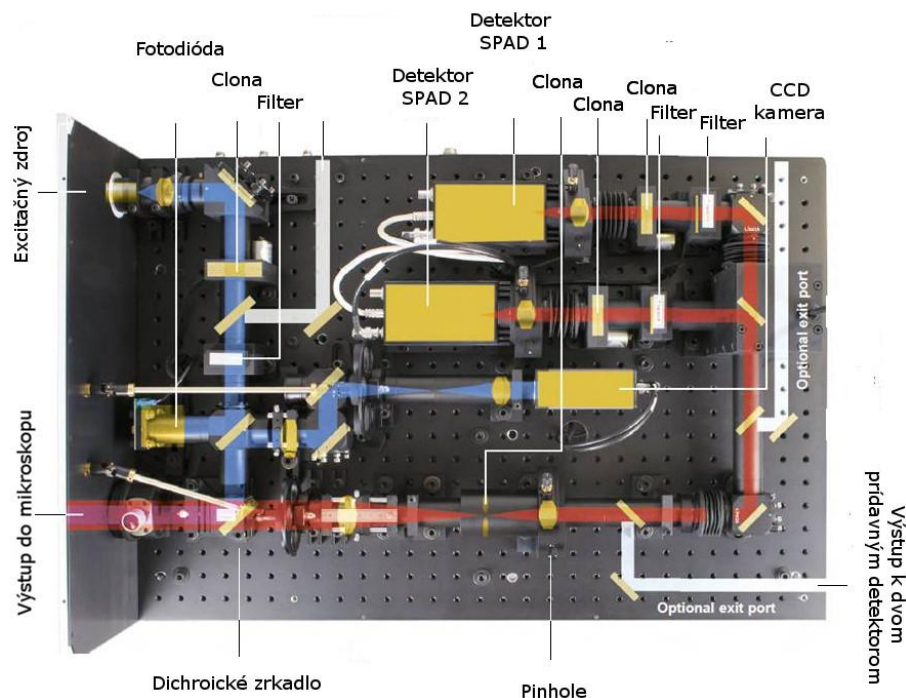
4.2. Prístroje a zariadenie

4.2.1. Microtime 200

Microtime 200 je systém konfokálneho mikroskopu pre meranie rôznych módov fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Skladá sa z inverzného mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačnej jednotky a detekčného systému. Prístroj je ďalej vybavený externým spektrografom s CCD kamerou.

Ako excitačné zdroje sa v systéme používajú pulzné pikosekundové diódové lasery vo vlnových dĺžkach 375, 405, 440, 470, 510 a 640 nm s frekvenciami do 80 MHz. Prístroj obsahuje externý femtosekundový laser s vlnovou dĺžkou 1030 – 1050 nm.

Na detekciu systém môže využívať štyri nezávislé detektorové kanály. Dva z nich sú typu τ -SPAD so šumom pod $100 \text{ cnts} \cdot \text{s}^{-1}$ a so spektrálnym rozmedzím 400 - 1000 nm. Ďalšie dva sú detektory typu PDM-SPAD so šumom pod $250 \text{ Cnts} \cdot \text{s}^{-1}$. Schému prístroja znázorňuje obrázok 21 [42].



Obrázok 21: Schéma prístroja Microtime 200

4.3. Použité programy

- SymPhoTime 64 – integrovaný software pre zber a analýzu dát
- Microsoft Excel – Software pre vyhodnotenie dát

4.4. Pracovné postupy

4.4.1. Príprava zásobných roztokov tenzidov

Zásobne roztoky všetkých tenzidov boli pripravené navážením potrebného množstva danej látky a analytickým doplnením rozpúšťadla na požadovaný objem. Ako rozpúšťadlo bola použitá deionizovaná Milli-Q voda a 0,15 M roztok NaCl, ktorý bol taktiež pripravený navážením potrebného množstva pevného NaCl a doplnený Milli-Q vodou na požadovaný objem.

Koncentrácia tenzidov bola volená niekoľkonásobne vyššia ako je CMC, aby v tenzidoch aj pri prípadnom riedení vzorku nedošlo k rozpadu micel. CMC a pripravovanú koncentráciu roztokov zhrňuje tabuľka 4.2. Následne boli roztoky dôkladne premiešané na magnetickej miešačke a uchované pri laboratórnej teplote.

Tabuľka 4.2: Prehľad použitých tenzidov – kritická micelárna koncentrácia a pripravovaná koncentrácia pre tento experiment

Tenzid	CMC	Pripravovaná koncentrácia
CTAB	1 mM	30 mM
Septonex	0,9 mM	100 mM
SDS	8,3 mM	80 mM
Triton X-100	0,2 mM	80 mM

4.4.2. Príprava zásobných roztokov fluorescenčných sond

Zásobné roztoky perylenu, nílскеj červeni, DiD a DiO o koncentrácií 10^{-3} mol·dm⁻³ boli pripravené navážením potrebného množstva sondy rozpustením vo vhodnom organickom rozpúšťadle (acetón, chloroform, DMSO). Pripravené roztoky boli uchované v chladničke pri teplote 4°C.

4.4.3. Príprava vzoriek tenzidov pre meranie

Do čistých sklenených vialiek boli napipetované fluorescenčné sondy, organické rozpúšťadlo bolo odparené a vialky boli doplnené pripravenými zásobnými roztokmi tenzidov. Do vialiek bolo pipetované také množstvo fluorescenčnej sondy, aby po odparení a doplnení bola jej koncentrácia 2 nM. Všetky vzorky boli premiešané na trepačke a uchované pri laboratórnej teplote. Pre vlastné meranie na mikroskope boli podľa potreby vzorky rôzne nariedované, aby ich koncentrácia bola pre meranie optimálna a nedochádzalo k nežiadúcim efektom. Presná koncentrácie fluorescenčných sond sú uvedené pri konkrétnych systémoch vo výsledkoch.

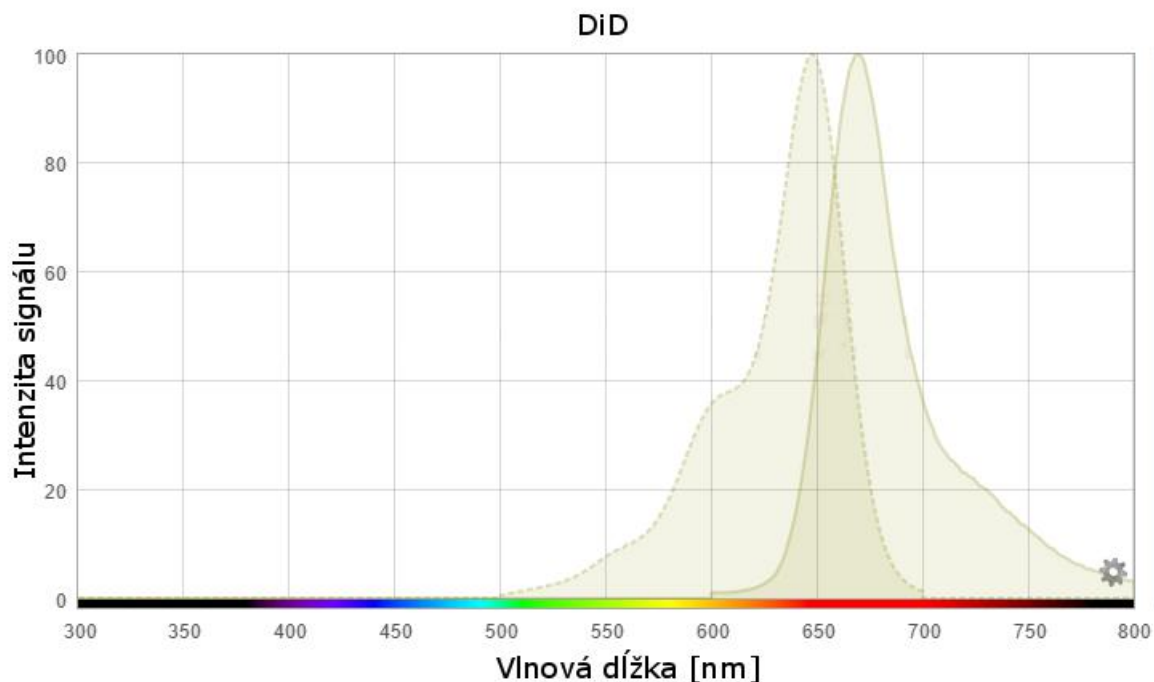
4.4.4. Príprava vzoriek fosfolipidov pre meranie

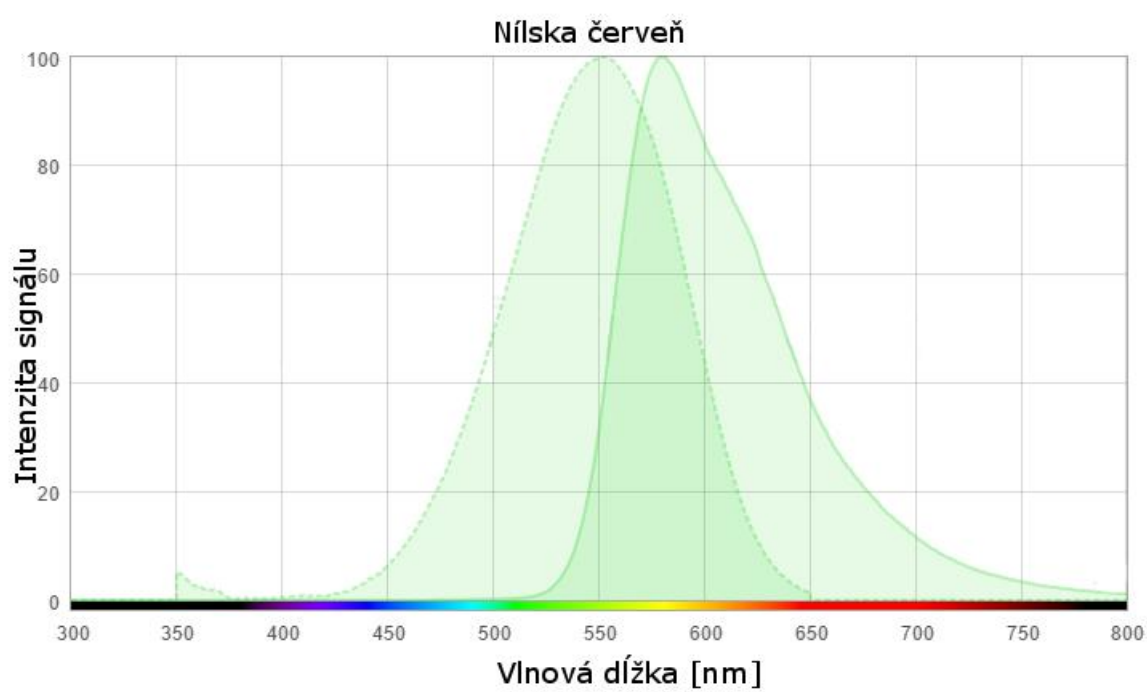
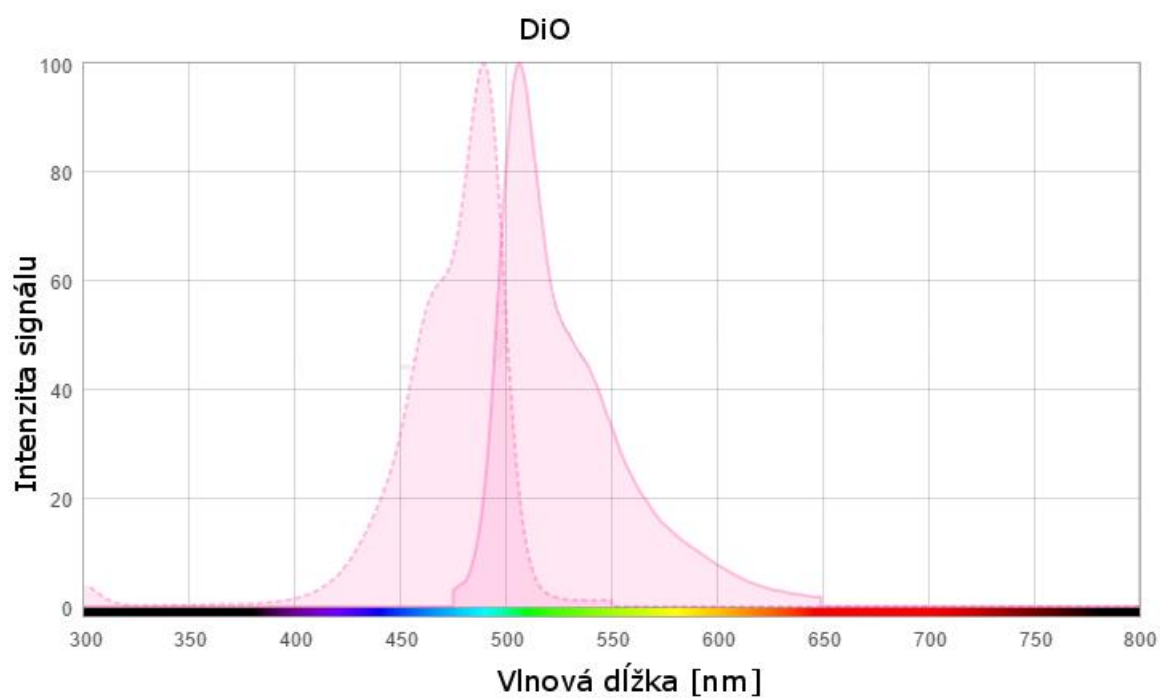
Do čistých sklenených vialiek bolo napipetované také množstvo fluorescenčných farbív DiD a DiO, aby výsledná koncentrácia bola $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Organické rozpúšťadlo bolo odparené a následne bolo na odparok sondy pipetované množstvo roztoku fosfolipidu v chloroforme tak, aby výsledná koncentrácia fosfolipidu bola $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Chloroform bol následne odparený a do vialiek bolo napipetované 5 ml Milli-Q vody. Roztok bol roztrepaný na vortexe za vzniku kalnej suspenzie a následne bol sonifikovaný na ultrazvuku až do úplného vyčistenia.

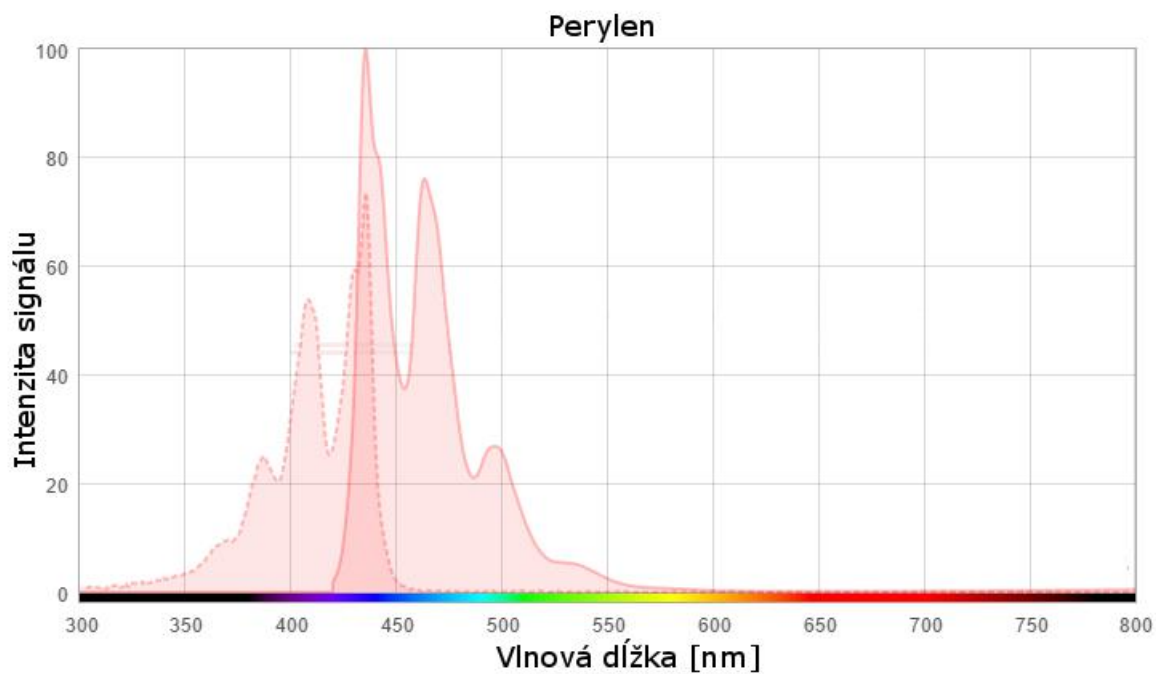
4.5. Vlastné meranie

Najskôr bolo hľadané optimálne nastavenie systému Microtime 200. Boli vyskúšané rôzne druhy excitácie – koexcitácia, PIE a kombinácia jedného laseru v kontinuálnom móde (CW) a druhého v pulznom móde. Excitačná dĺžka laseru sa volila tak, aby pokiaľ možno excitovala vybrané fluorescenčné sondy (perylen, nílka červen, DiD a DiO) v excitačnom maxime. Excitačné spektrá týchto sond sú vyobrazené na obrázku 22

Tak isto boli vyskúšané aj rôzne kombinácie detektorov - kombinácia detektorov typu τ -SPAD a aj kombinácia detektorov PDM-SPAD. Emisné filtre boli vybrané podľa emisného maxima vybraných sond (taktiež vyobrazené na obrázku 22. Pre nílku červen bolo vyskúšaných viacero emisných filtrov, nakoľko emitovaná vlnová dĺžka tejto sondy je závislá na polarite prostredia.







Obrázok 22: Excitačné (čiarkovane) a emisné (plnou čiarou) spektrá použitých fluoresce-
ných sond, konkrétne DiD, DiO, Nílska červeň a Perylen. [44]

5. Výsledky a diskusia

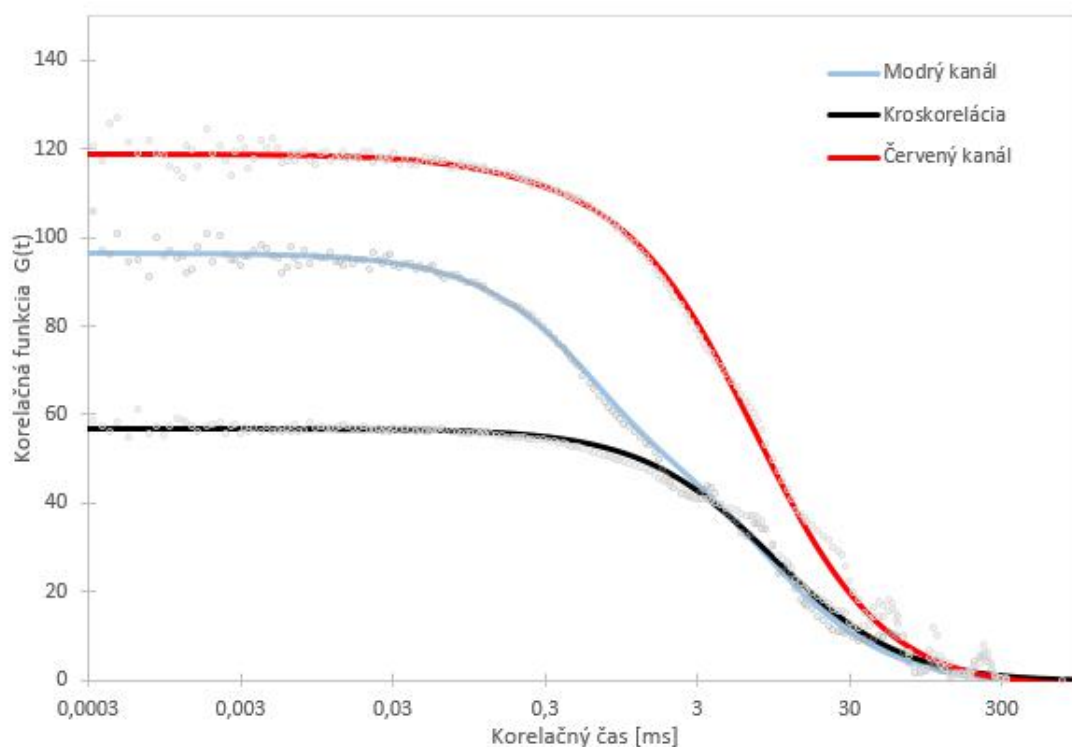
5.1. Tetraspecky

Pred začatím samotnej práce bolo potrebné nájsť systém, na ktorom by sme si preverili a potvrdili funkčnosť FCCS. Tetraspecky sú častice o veľkosti 100 nanometrov. Každá častica je zafarbená 4 rôznymi farbivami s dobre oddelenými excitačnými a emisnými maximami (tabuľka 5.1).

Tabuľka 5.1: Absorpčné a emisné vlastnosti tetraspeckov

Farba	Excitačné maximum v nm	Emisné maximum v nm
Modrá	360	430
Zelená	505	515
Oranžová	560	580
Červená	660	680

Na excitáciu tohto systému bol použitý laser o vlnovej dĺžke 405 nm, ktorý vyexcitoval modré farbivo a laser o vlnovej dĺžke 635 nm ktorý vyexcitoval červené farbivo. Obidva použité detektory boli typu τ -SPAD a použité emisné filtre boli 440/40 pre modrý kanál a 690/70 pre červený kanál.



Obrázok 22: Korelačné krivky pre systém Tetraspecky. Na modrom kanály bol použitý emisný filter 440/40 a na červenom kanály 690/70.

Vzhľadom k tomu, že v systéme tetraspeckov sledujeme 1 časticu ktorá je označená viacerými farbivami, na obrázku 22 môžeme vidieť 2 autokorelačné funkcie a kros-korela-

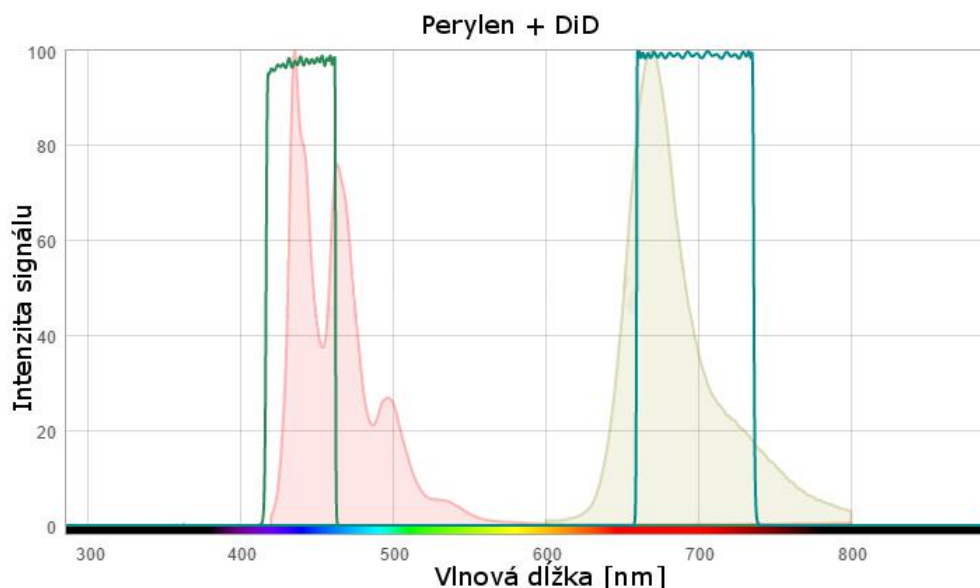
čnú funkciu, ktorá je o trochu nižšie ako autokorelačné krivky. Všetky tri korelačné funkcie sú si svojim priebehom veľmi podobné.

Tetraspecky majú známy difúzny koeficient – vo vode pri 25°C je to $4,4 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [43]. Pomocou tohto difúzneho koeficientu bolo v programe SymPhoTime 64 z kros-korelačnej funkcie pre dané nastavenie určený efektívny objem a pomer z_0/r_0 . Efektívny objem bol určený na 0,66 femtolitrov a pomer z_0/r_0 bol určený na 4. Toto nastavenie efektívneho objemu a z_0/r_0 bolo využité pri analýze meraných vzoriek v programe SymPhoTime 64.

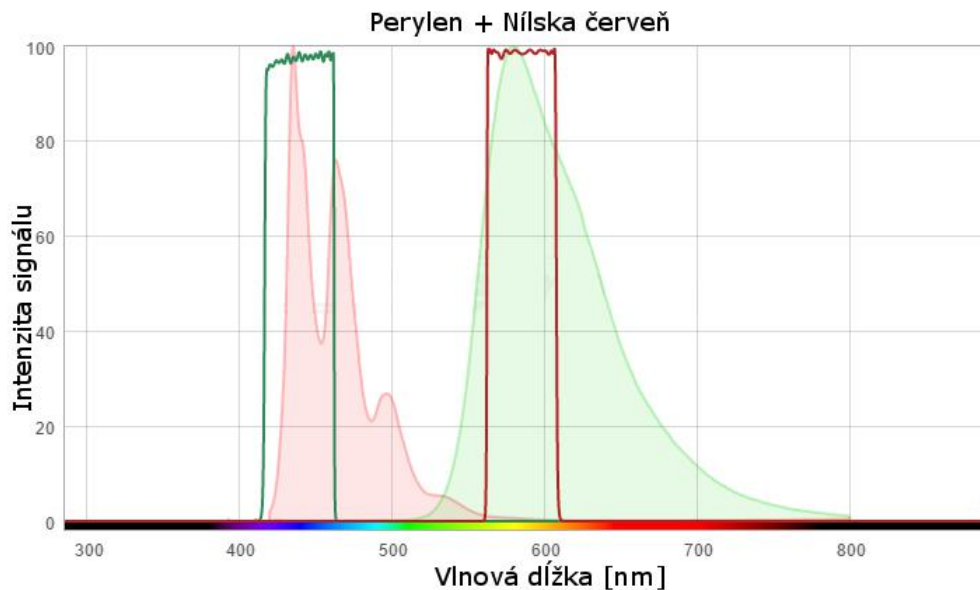
5.2. Výber kombinácie fluorescenčných sond

Na základe rešerše bolo navrhnuté nasledujúce kombinácie sond:

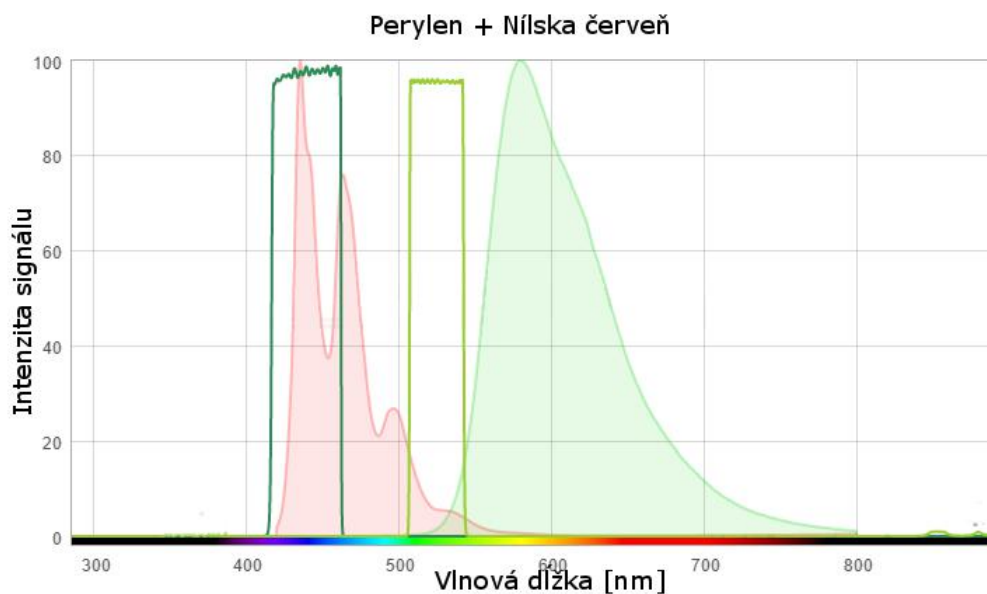
- perylen + nílka červená,
- perylen + DiD,
- DiO + DiD.



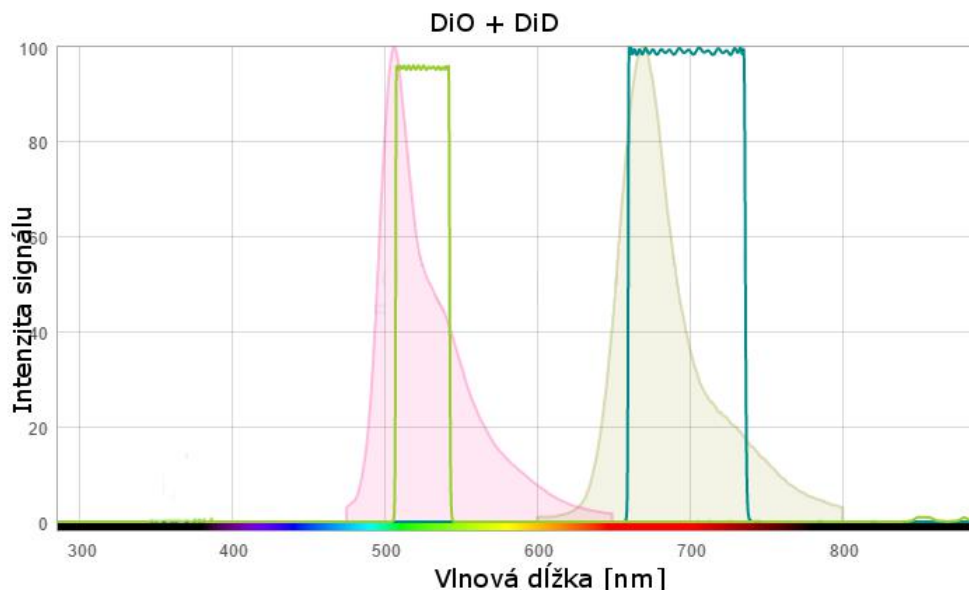
Obrázok 23: Emisné spektrá kombinácie sond perylen (červenou) + DiD (hnedom) s vyznačenými použitými emisnými filtermi - pre perylen 440/40 a pre DiD 690/70 [44].



Obrázok 24: Emisné spektrá kombinácie sond perylen (červenou) + nílka červeň (zelenou) s vyznačenými použitými emisnými filrami - pre perylen 440/40 a pre nílku červeň 585/40 [44].



Obrázok 25: Emisné spektrá kombinácie sond perylen (červenou) + nílka červeň (zelenou) s vyznačenými použitými emisnými filrami - pre perylen 440/40 a pre nílku červeň 520/35 [44].



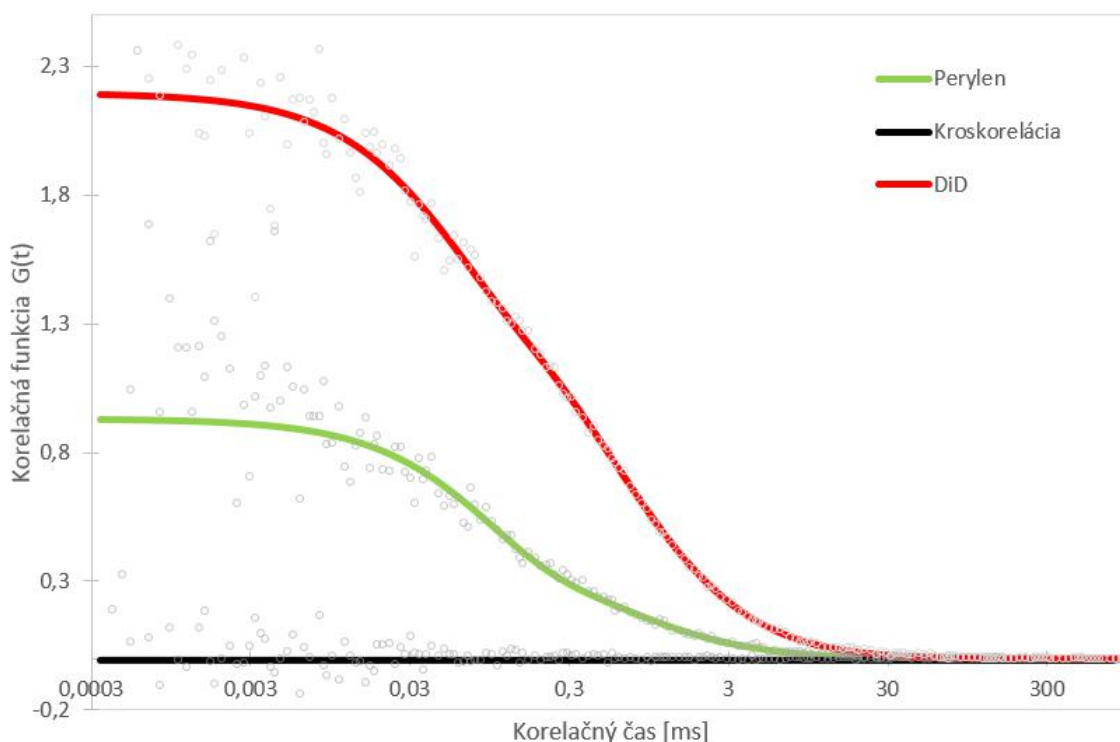
Obrázok 26: Emisné spektrá kombinácie sond DiO (červenou) + DiD (hnedou) s vyznačenými použitými emisnými filtrami - pre DiO 520/35 a pre DiD 690/70 [44].

5.3. Tenzidy

Na začiatku tejto práce bol predpoklad, že algoritmus vyhodnocujúci FCCS zohľadňuje podobnosť systémov a teda dve identické micely, ktoré budú vytvorené z rovnakého tenzidu s rovnakou veľkosťou, označené iným fluorescenčným farbivom sú si natoľko podobné, že budú vykazovať kros-koreláciu. Pre overenie tohto predpokladu boli zmiešané dva micelárne roztoky toho istého tenzidu, každý z týchto roztokov s iným fluorescenčným farbivom. Pre všeobecné posúdenie a zhodnotenie vybranej metódy boli vybrané tenzidy z viacerých kategórií – anionaktívny tenzid SDS tvoriaci malé micely, kationaktívny Sep-tonex a CTAB, ktorých micely sú strednej veľkosti a neionogénny Triton tvoriaci veľké micely.

5.3.1. Neionogénne tenzidy: Triton X-100

Sledovaný systém obsahoval micely neionogénneho tenzidu Triton X-100 vo vode označené fluorescenčným farbivom perylenom o koncentracii 0,55 nM a micely označené DiD o koncentracii 0,32 nM. Tento systém bol excitovaný excitačnými zdrojmi o vlnových dĺžkach 405 nm a 635 nm s frekvenciou 40 MHz. Na detekciu boli použité detektory typu PDM-SPAD s emisnými filtrami 440/40 pre perylen a 690/70 pre DiD. Túto kombináciu zobrazuje obrázok 23.

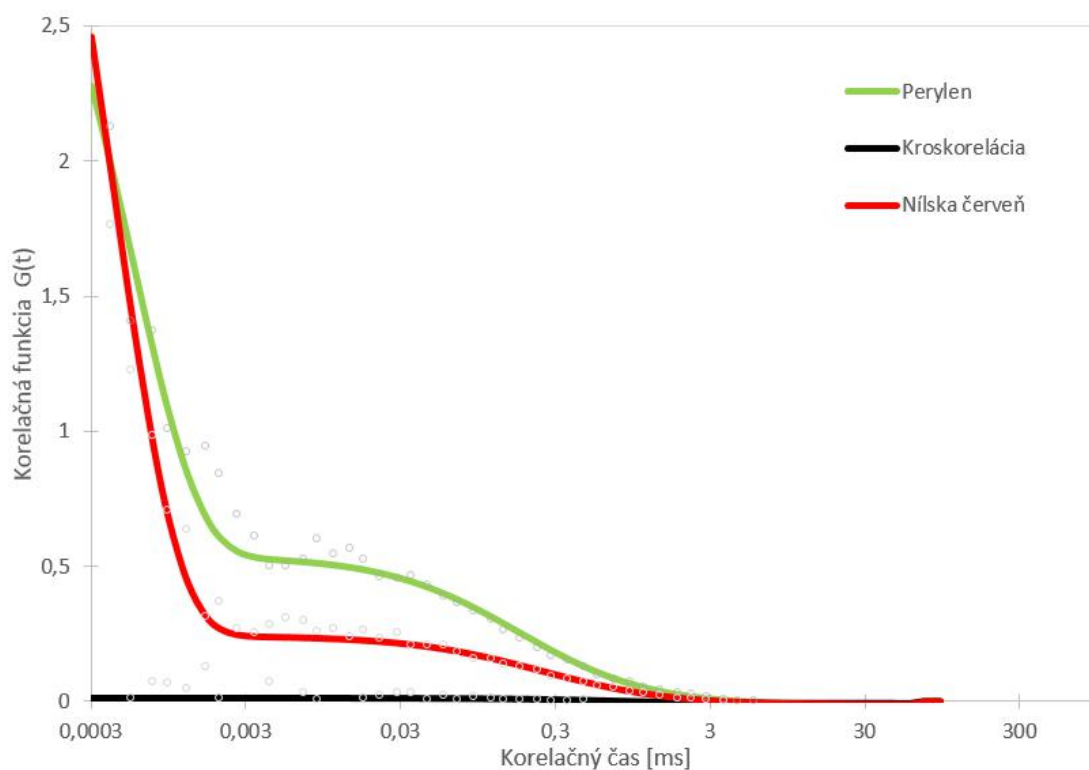


Obrázok 27: Korelačné krivky pre micely Tritonu X-100 vo vode obsahujúce kombináciu sond perylen + DiD. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre DiD 690/70.

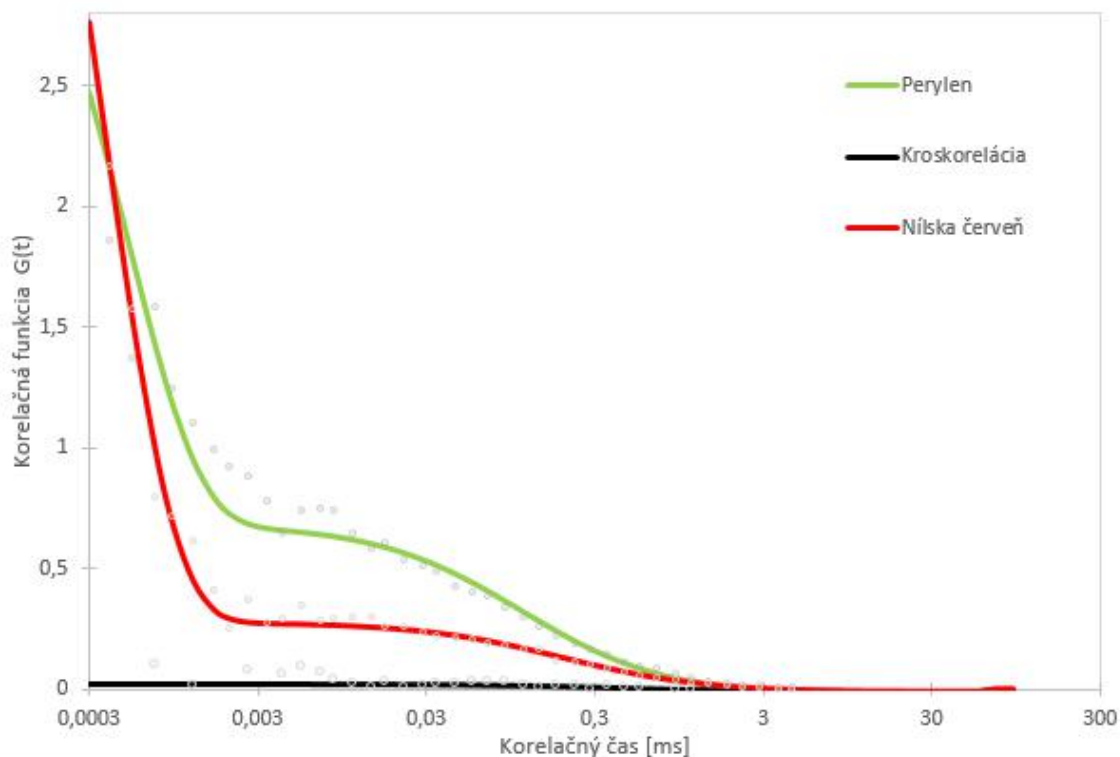
Na obrázku 27 je vidieť autokorelačnú krivku pre perylen a autokorelačnú krivku pre DiD. Obidve tieto krivky majú podobný priebeh. Podobný priebeh autokorelačných kriviek naznačuje, že micely sú si veľmi podobné. No napriek tomu, k žiadnej kros-korelácii nedošlo a výsledná kros-korelačná krivka je nulová.

5.3.2. Katiónaktívne tenzidy: CTAB

Micelárny roztok tenzidu CTAB bol pripravovaný aj vo vode aj v NaCl. Obidva sledované vzorky obsahovali kombináciu sond perylen a nílka červen. Koncentrácia peryleny vo vodnom roztoku CTAB bola 0,8 nM a koncentrácia nílkej červen 0,5 nM. CTAB v NaCl obsahovalo 0,5 nM peryleny a 0,5 nM nílkej červen. Fluorescenčný signál bol sledovaný detektormi typu τ -SPAD. Na detekciu peryleny bol použitý filter 440/40 a na detekciu nílkej červen bol použitý filter 585/40 (obrázok 24). Systém bol excitovaný lasermi o vlnovej dĺžke 405 nm a 470 nm s frekvenciou 20 MHz.



Obrázok 28: Korelačné krivky pre micely CTAB vo vode obsahujúce sondy perylen a nílскеj červeň. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre nílsku červeň 585/40.

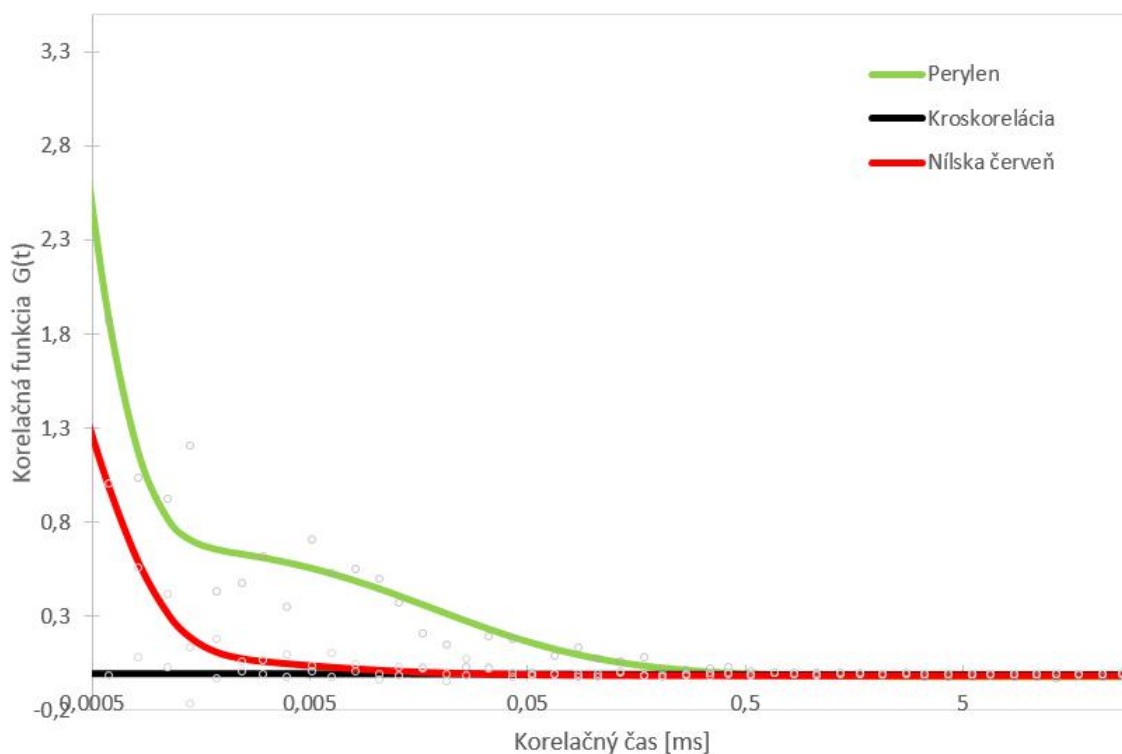


Obrázok 29: Korelačné krivky pre micely CTAB v NaCl obsahujúce kombináciu perylen a nílскеj červeň. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre nílsku červeň 585/40.

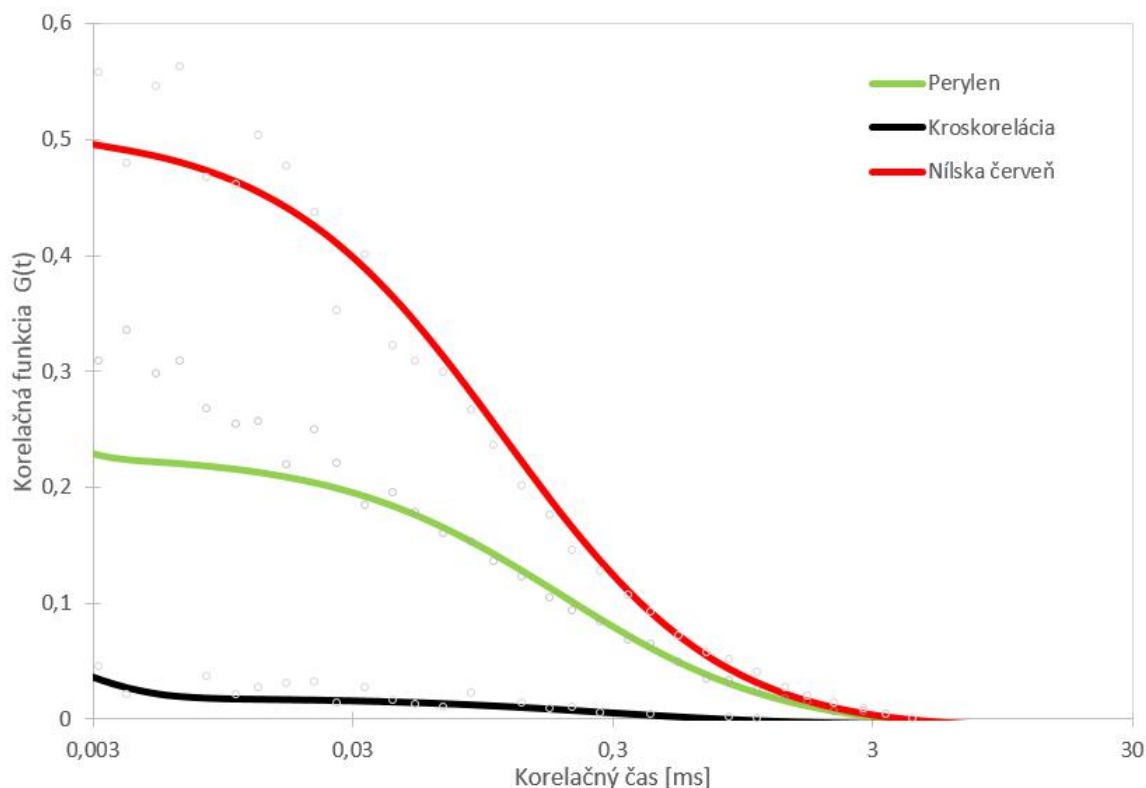
Na obrázku 28 a obrázku 29 je vidieť autokorelačné krivky pre perylen a pre nílsku červeň v micelách CTAB. V obidvoch grafoch je možné pozorovať takmer zhodný tvar autokorelačných kriviek pre jednotlivé fluorescenčné sondy. Porovnaním týchto dvoch grafov je možné sledovať relatívne zhodný priebeh týchto jednotlivých autokorelačných funkcií bez ohľadu na to, či boli pripravené vo vodnom roztoku alebo v roztoku NaCl. Aj keď autokorelačné krivky sú si veľmi podobné, kros-korelačná krivka je v obidvoch grafoch nulová.

5.3.3. Katiónaktívne tenzidy: Septonex

Micely Septonexu boli pripravované vo vode a v NaCl. Obidva roztoky obsahovali perylen o koncentracii 0,5 nM a nílsku červeň o koncentracii 0,8 nM. Excitované boli kombináciou laserov 405 a 470 nm s frekvenciou 26,67 MHz. Detekcia prebehla na detektoroch typu τ -SPAD. Pri meraní vodného roztoku Septonexu boli použité emisné filtre 440/40 pre perylen a 585/40 pre nílsku červeň. Túto kombináciu sond a emisných filtrov znázorňuje obrázok 24. Septonex v NaCl bol detegovaný za pomoci emisného filtru 440/40 pre perylen a 520/35 pre nílsku červeň (obrázok 25).



Obrázok 30: Korelačné krivky pre micely Septonexu vo vode obsahujúce kombináciu sond perylen a nílka červeň. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre nílku červeň 585/40.



Obrázok 31: Korelačné krivky pre micely Septonexu v NaCl obsahujúce kombináciu sond perylen a nílska červeň. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre nílsku červeň 520/35.

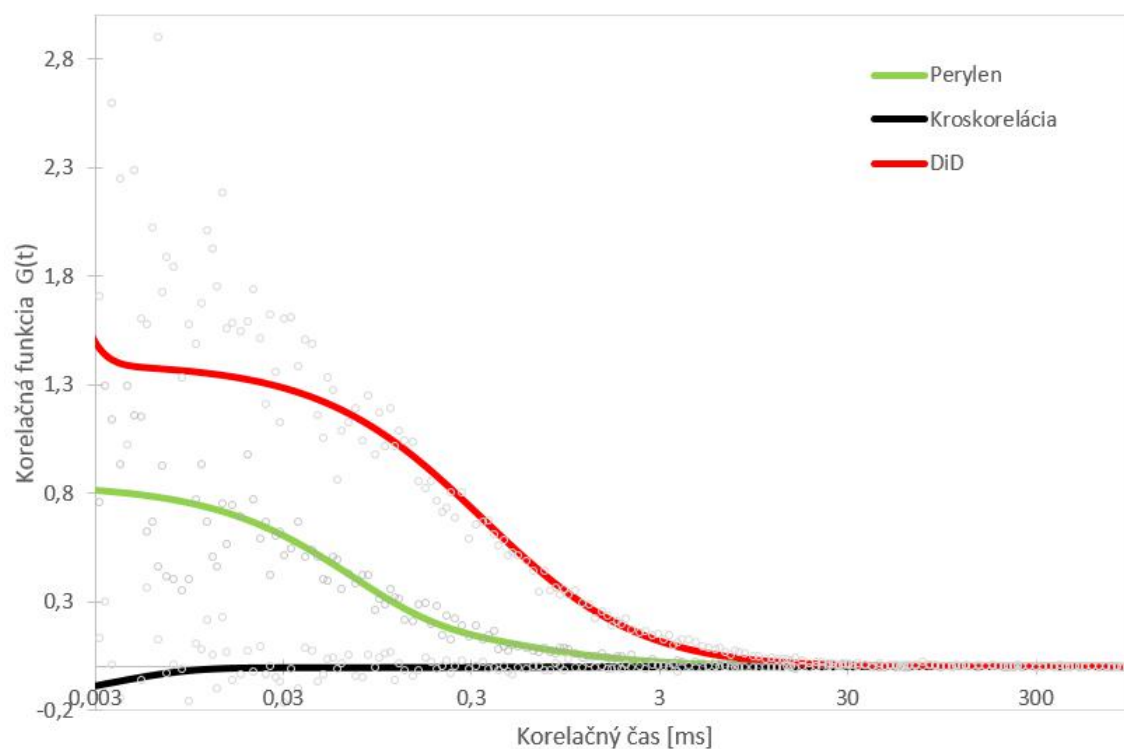
Pri meraní micelárnych roztokov Septonexu vo vode a v NaCl boli na detekciu nílskej červene použité rozdielne emisné filtre. Tieto odlišné emisné filtre boli pre nílsku červeň skúšané z toho dôvodu, že vlnová dĺžka emitovaného žiarenia touto sondou je závislá na polarite prostredia v ktorom sa nachádza a vzhľadom k tomu, že v micelárnych roztokoch sa môže nachádzať aj vo vodnom prostredí, aj solubilizovaná v micelách, jej emisné vlastnosti môžu byť rôzne.

Na obrázku 30 je možné vidieť autokorelačnú funkciu pre perylen a pre nílsku červeň pre micely Septonexu vo vode. Kros-korelácia v tomto systéme je nulová.

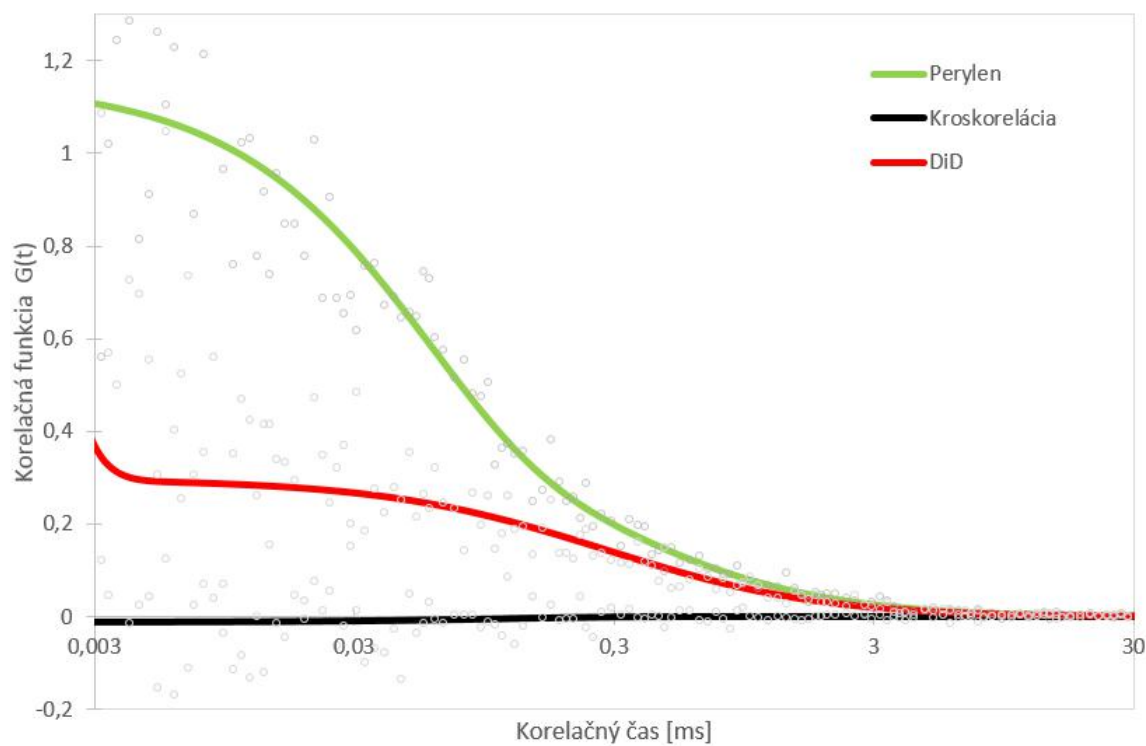
Na detekciu nílskej červene v systéme Septonex v NaCl bol použitý emisný filter 520/35. Už obrázok 25 napovedá, že to nebola správna voľba, nakoľko tento filter zachytáva časť emisného spektra perylenu. Preto kros-korelačná krivka, ktorú je možné vidieť na obrázku 31 nie je v skutočnosti kros-korelácia, ale cross-talk medzi kanálmi, kedy bol signál z perylenu detegovaný na oboch detektoroch.

5.3.4. Aniónaktívne tenzidy: SDS

Micely dodecylsulfátu sódného boli pripravené vo vodnom roztoku aj v roztoku NaCl. Obidva pripravené roztoky boli označené perylenom o koncentrácii 0,4 nM a DiD o koncentrácii 0,5 nM. Excitácia fluorescenčných sond prebehla pomocou laserov s vlnovou dĺžkou 405 a 635 nm s frekvenciou 40 MHz. Signál bol detegovaný na detektoroch typu PDM-Spad s emisnými filtermi 440/40 pre perylen a 690/70 pre DiD. Túto kombináciu sond a filtrov znázorňuje obrázok 23.



Obrázok 32: Korelačné krivky pre micely SDS vo vode obsahujúce kombináciu sond perylen a DiD. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre DiD 690/70.



Obrázok 33: Korelačné krivky pre micely SDS v NaCl obsahujúce kombináciu sond perylen a DiD. Pre perylen bol použitý emisný filter 440/40 a pre DiD 690/70.

Micelárny roztok tenzidu SDS ani vo vode ani v NaCl nevykazuje kros-koreláciu. Je to možné sledovať na obrázkoch 32 a 33, kedy je možné v oboch obrázkoch vidieť autokorelačné krivky pre obe farbivá, avšak kros-korelačná krivka je nulová.

Z týchto nameraných a vyhodnotených dát je vidieť, že predpoklad na začiatku tejto práce nebol správny. Micelárne systémy nie sú vhodný systém pre techniku FCCS. Napriek tomu, že v takmer všetkých systémoch je vidno dve krásne, skoro rovnaké autokorelačné funkcie, kros-korelačná krivka je nulová. Jediný systém, kde nie je nulová je v grafe 31, Septonex v NaCl, kedy však z obrázku 25 môžeme vidieť, že nebol použitý vhodný emisný filter a pravdepodobne teda došlo k cross-talku medzi kanálmi. Z výsledkov merania je možné konštatovať, že pre analýzu pomocou FCCS nestačí, aby sledované systémy boli podobné (ako sú dve zhodné micely označené dvoma rôznymi farbivami), ale pozorovaný systém musí byť identický a teda, obidve sondy musia byť naviazané na tej istej častici.

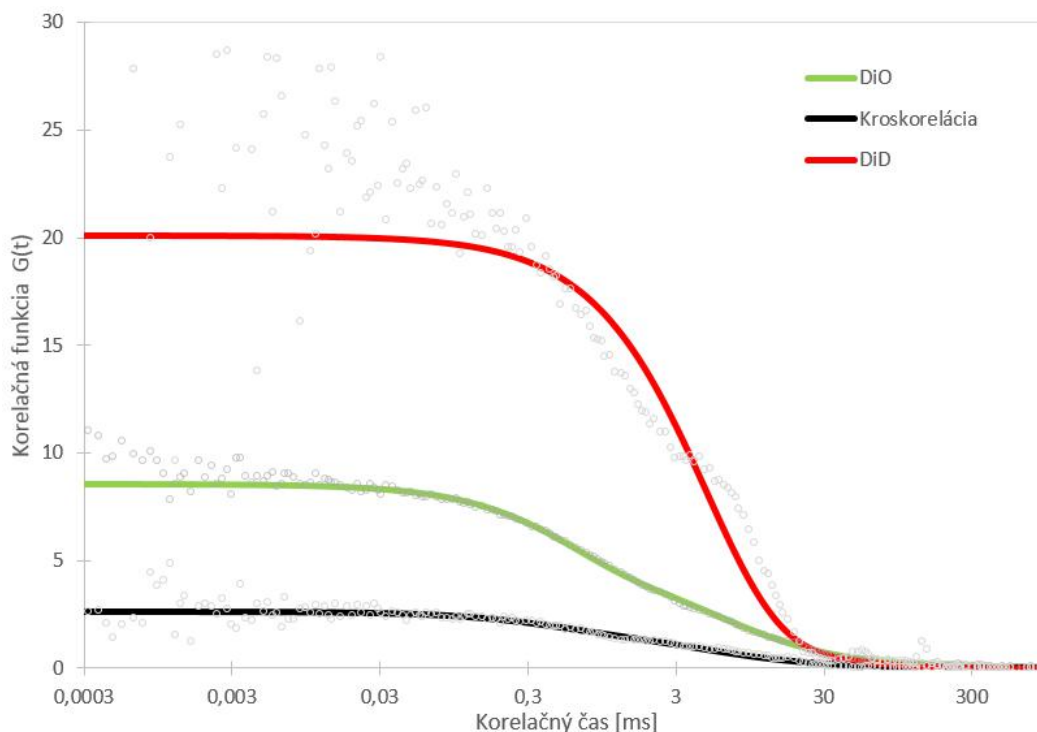
To je však v micelárnych roztokoch tenzidov problém. Optimálna koncentrácia fluorescenčnej sondy pre meranie sa pohybuje v nanomolárnych koncentráciách, zatiaľ čo kritická micelárna koncentrácia pre roztoky tenzidov je typicky v milimolárnych koncentráciách. Medzi koncentráciou micel a fluorescenčných sond je teda niekoľko rádový rozdiel. Pravdepodobnosť, že jedna micela bude označená obidvoma fluorescenčnými sondami je veľmi malá. Ak by sa aj vo vzorku takéto micely nachádzali, v pomere k micelám značeným jednou sondou by ich bolo zanedbateľne málo.

5.4. Fosfolipidy

Vzhľadom k tomu, že metóda FCCS nefungovala na micelárnych systémoch, naďalej sme hľadali systém, ktorý by bol vhodný pre túto techniku. Do úvahy prichádzali amfotérne dvojreťazcové tenzidy – fosfolipidy. Fosfolipidy majú nižšiu kritickú micelárnu koncentráciu ako tenzidy. Kritická micelárna koncentrácia fosfolipidov sa pohybuje v mikromolárnych až nanomolárnych koncentráciách. Tieto hodnoty CMC sú podobné s koncentraciami fluorescenčných sond, ktoré sa používajú na meranie a preto by nemal byť problém pripraviť vzorku o podobnej koncentrácii lipozómov a fluorescenčných farbív a zvýšiť tak pravdepodobnosť, že jedna častica bude označená dvoma sondami.

5.4.1. Lecithin

Do fosfolipidovej dvojvrstvy boli zabudované dve fluorescenčné sondy s dostatočne oddelenými emisnými spektrami – DiO a DiD. Na excitáciu týchto systémov boli použité lasery o vlnovej dĺžke 470 a 635 nm, detekcia prebehla na detektoroch τ -SPAD s emisnými filtermi 520/35 pre DiO a 690/70 pre DiD. Emisné spektrá a použité filtre znázorňuje obrázok 26.



Obrázok 34: Korelačné krivky pre Lecithin. Do fosfolipidovej dvojvrstvy bola zabudovaná kombinácia sond DiD a DiO. Pre detekciu DiO bol použitý emisný filter 520/35 a pre DiD 690/70.

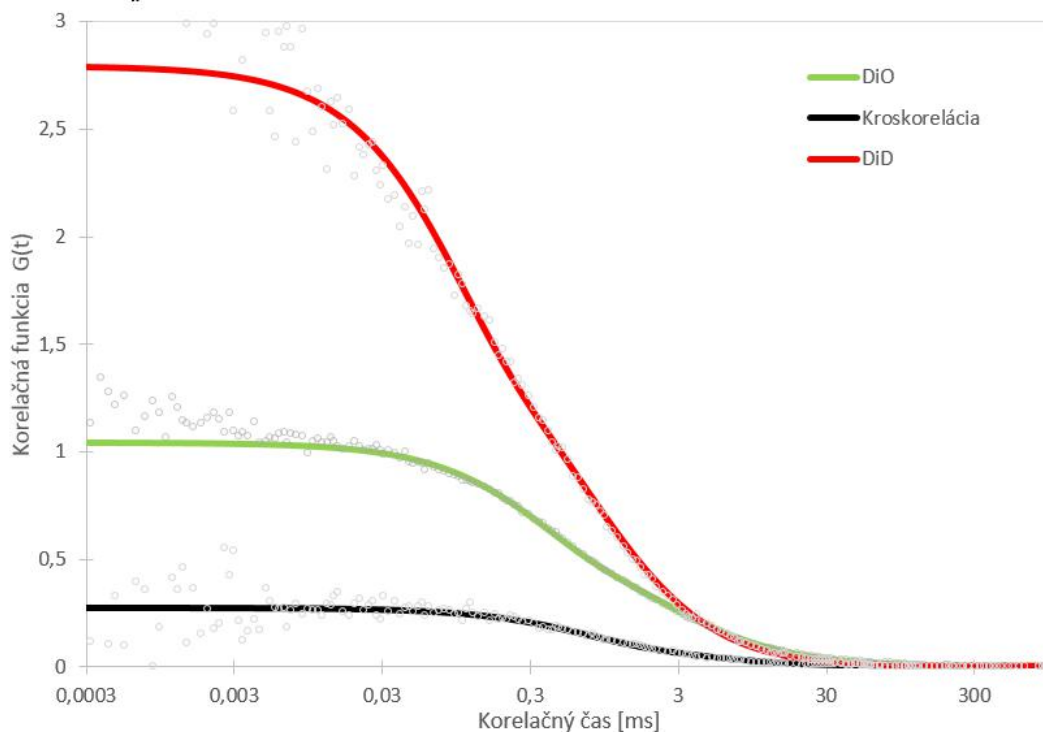
Tabuľka 5.2: Zistené difúzne koeficienty pre Lecithin

Korelačná funkcia	Zistený difúzny koeficient
Autokorelačná funkcia pre DiO	$4,3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Autokorelačná funkcia pre DiD	$0,9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Kros-korelačná funkcia	$5,7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Na obrázku 34 je vidieť autokorelačnú krivku pre sondu DiD, autokorelačnú krivku pre sondu DiO a kros-korelačnú krivku. Vzhľadom k tomu, že pri tejto použitej kombinácii fluorescenčných sond a emisných filtrov by nemalo dochádzať k žiadnemu neželanému cross-talku, táto kros-korelačná krivka by naozaj mala príslušať kros-korelácií. To znamená, že v tomto sledovanom systéme sa naozaj nachádzali lipozómy, ktoré boli označené obidvoma fluorescenčnými farbivami. Z kros-korelačnej funkcie mohol byť následne v programe SymPhoTime 64 pomocou efektívneho objemu a pomeru z_0/r_0 zisteného vďaka tetraspeckom vypočítaný difúzny koeficient. Ten bol určený na $5.7 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

5.4.2. POPG

Lipozómy tvorené fosfolipidom POPG taktiež obsahovali kombináciu fluorescenčných sond DiO a DiD. Na detekciu DiO bol použitý filter 520/35 a na detekciu DiD sa použil filter 690/70. Túto situáciu znázorňuje obrázok 26. Použité detektory boli typu τ -SPAD a na excitáciu bola použitá kombinácia laserov 470 a 635 nm.



Obrázok 35: Korelačné krivky pre Lecithin. Do fosfolipidovej dvojvrstvy bola zabudovaná kombinácia sond DiD a DiO. Pre detekciu DiO bol použitý emisný filter 520/35 a pre DiD 690/70.

Tabuľka 5.3: Zistené difúzne koeficienty pre POPG

Korelačná funkcia	Zistený difúzny koeficient
Autokorelačná funkcia pre DiO	$10 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Autokorelačná funkcia pre DiD	$33 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Kros-korelačná funkcia	$9,9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

V lipozómoch tvorených fosfolipidom POPG je možné sledovať kros-koreláciu. Dokazuje to obrázok 35. V tomto grafe sú vidieť dve autokorelačné krivky - jedna pre DiD a druhá pre DiO a kros-korelačná krivka. Tak isto ako pri Lecithine, pri tejto kombinácii sond a emisných filtrov by nemalo dochádzať ku cross-talku a zistený kros-korelačný signál by mal pochádzať z tej frakcie lipozómov, ktoré boli označené obidvoma sondami. Z kros-korelačnej funkcie bol opäť v programe SymPhoTime 64 pomocou efektívneho objemu a pomeru z_0/r_0 zisteného vďaka tetraspeckom vypočítaný difúzny koeficient. Ten bol určený na $9.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

Fosfolipidy sa ukázali ako vhodný systém pre techniku FCCS. Ich kritická micelárna koncentrácia je podobná koncentrácií fluorescenčných farbív používaných pre fluorescenčné merania. Vďaka tomu je možné pripraviť roztoky s podobnou koncentráciou lipozómov a fluorescenčných sond, čím sa zvýši pravdepodobnosť výskytu lipozómov označených obidvoma sondami.

6. Záver

Cieľom tejto práce bolo vyskúšať a optimalizovať metódu dvojfarebnej fluorescenčnej kros-korelačnej spektroskopie, nakoľko táto metóda u nás na Fakulte chemickej doteraz nebola použitá. Na meranie boli použité roztoky tenzidov v takej koncentrácii aby vytvárali micely. Z výsledkov však môžeme konštatovať, že metóda FCCS na meranie micelárnych systémov nie je vhodná. Dvojfarebná fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia sleduje a vyhodnocuje podobnosť dvoch fluorescenčných signálov. Avšak, nestačí, aby dva pozorované signály boli podobné, musia byť identické. Pre micelárne systémy by teda táto metóda bola vhodná len v prípade ak by sa použili micely označené dvoma farbami – tu je ale veľký problém s koncentráciami. Pre meranie FCCS je optimálne používať fluorescenčné sondy v nanomolárnej koncentrácii, zatiaľ čo väčšina tenzidov má CMC v jednotkách až desiatkach milimolárnej koncentracie. Ak by sa použila aj najvyššia možná koncentrácia fluorescenčnej sondy, pri ktorej by nedochádzalo ku žiadnym nepriaznivým efektom a najnižšia možná koncentrácia tenzidu, pri ktorej by nedochádzalo k rozpadu micel, rozdiel koncentrácií by sa stále pohyboval okolo troch rádov a teda pravdepodobnosť, že by jedna micela bola označená dvoma fluorescenčnými sondami by bola veľmi malá. Vo vzorku by sa pravdepodobne nachádzala najväčšia časť voľných micel, potom micely označené jedným alebo druhým farbivom a len veľmi malý fragment micel označených oboma. Tento fragment by bol pravdepodobne natoľko malý, že kros-korelačná funkcia by sa blížila k nule.

Táto metóda sa však ukázala ako veľmi užitočná pri meraní lipozómov. Fosfolipidy majú na rozdiel od tenzidov relatívne nízke hodnoty CMC, takže aj v nízkych koncentraciách vytvoria lipozómy a sú preto relatívne neobmedzene riediteľné. Vďaka tomu u nich nedochádza k vyššie popísanému problému s koncentráciami. Je možné pripraviť roztok, ktorý bude obsahovať približne rovnaké koncentracie lipozómov a fluorescenčných sond, čím sa značne zvýši pravdepodobnosť výsytu dvojfarebne značených lipozómov. Takýto roztok je potom následne možné zriediť na takú koncentráciu, ktorú je schopný fluorescenčný mikroskop analyzovať. Pre lipozomálne systémy bola navrhnutá kombinácia sond DiD a DiO. Pokiaľ sa pri tejto kombinácii sond vhodne zvolia emisné filtre, nebude dochádzať k neželanému cross-talku medzi kanálmi.

Napriek tomu, že táto metóda sa nedá použiť na jedny z najpoužívanejších systémov u nás na fakulte, aj tak má potenciál stať sa užitočnou a neoddeliteľnou súčasťou výskum. Je ju možné využiť napríklad pri pozorovaní interakcii fluorescenčne značených polymérov a micel, pri štúdiu bunecných membrán alebo na skúmanie väzbových interakcií v oblasti molekulárnej biológie.

Literatúra

- [1] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications. Second edition.* Chichester, England: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012. ISBN 978-3-527-65003-3.
- [2] FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. 2003, , 88 [cit. 2017-04-04].
Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>
- [3] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [4] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy.* 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [5] TURRO, Nicholas J., V. RAMAMURTHY a J. C. SCAIANO. *Principles of molecular photochemistry: an introduction.* Sausalito, Calif.: University Science Books, c2009. ISBN 978-1-891389-57-3.
- [6] JAFFE, H. H. a Albert L. MILLER. *The fates of electronic excitation energy.* *Journal of Chemical Education* [online]. 1966, 43(9), 469- [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1021/ed043p469. ISSN 0021-9584.
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed043p469>
- [7] BERANOVÁ, LENKA, JANA HUMPOLÍČKOVÁ a MARTIN HOF. *Fluorescenční korelační spektroskopie.* *Chemické Listy* [online]. 2009(103), 125-129 [cit. 2017-04-11].
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [8] WU, Chia-Yan, Chuan-Keng HUANG, Chao-Yu CHUNG, et al. Probing the binding kinetics of proinflammatory cytokine–antibody interactions using dual color fluorescence cross correlation spectroscopy. *The Analyst* [online]. 2011, 136(10), 2111- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1039/c0an00995d. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0an00995d>
- [9] FENG, Ligang, Jingfa YANG, Jiang ZHAO, Dapeng WANG, Kaloian KOYNOV a Hans-Jürgen BUTT. *Fluorescence correlation spectroscopy of repulsive systems: Theory, simulation, and experiment.* *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2013, 138(21), 214902- [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1063/1.4807860. ISSN 0021-9606. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4807860>
- [10] Perylene. *PubChem* [online]. National Center for Biotechnology Information, 2005, 6.5.2017 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/perylene#section=Top>
- [11] PANDITH, Anup, Giridhari HAZRA a Hong-Seok KIM. *A new fluorogenic sensing platform for salicylic acid derivatives based on $\pi - \pi$ and $NH - \pi$ interactions between electron-deficient and electron-rich aromatics* [online]. [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.saa.2017.01.053. ISBN 10.1016/j.saa.2017.01.053. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142517300732>

- [12] SPENCE, Michelle T. Z. a Iain D. JOHNSON. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 11th ed. Carlsbad, CA: Live Technologies Corporation, c2010. ISBN 09-829-2790-8.
- [13] DIAZ, Giacomo, Marta MELIS, Barbara BATETTA, Fabrizio ANGIUS a Angela Maria FALCHI. *Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio*. Micron [online]. 2008, 39(7), 819-824 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1016/j.micron.2008.01.001. ISSN 09684328. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968432808000097>
- [14] GHONEIM, Nagwa. Photophysics of Nile red in solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2000, 56(5), 1003-1010 [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.1016/S1386-1425(99)00199-7. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142599001997>
- [15] DiO⁺; DiOC18(3) (3,3'-Diocadecyloxacarboxyanine Perchlorate). *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D275>
- [16] *DiD, DiI, DiO and DiR for Labeling Cell Membranes*. ABD Bioquest, Inc [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/products/protocol/22101.pdf>
- [17] DiD⁺ oil; *DiIC18(5) oil (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarboxyanine Perchlorate)*. ThermoFisher Scientific [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D307?ICID=search-product>
- [18] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 3., přeprac. a rozš. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-337-1.
- [19] ŠČUKIN, E. D., A. V. PERCOV a E. A. AMELINOVÁ. *Koloidní chemie*. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-0259-6.
- [20] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-331-2.
- [21] LEKOPIS *Carbethopendecini bromidum*. [online]. [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecini_bromidum.htm
- [22] OREMUSOVÁ. *Influence of Adjuvances on the Drug Release from Hydrogels*. Scientia Pharmaceutica [online]. 2010, 78(3), 627-627 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.3797/scipharm.cespt.8.PDD38. ISSN 00368709. Dostupné z: www.mdpi.com/2218-0532/78/3/627
- [23] CTAB. *G-BIOSCIENCES* [online]. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://www.gbiosciences.com/CTAB>
- [24] EDS.: R. M. C. DAWSON .. *Data for biochemical research*. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publ, 1991. ISBN 9780198552994.
- [25] MURRAY, M. G. a W. F. THOMPSON. *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. *Nucleic Acids Res.* [online]. 1980 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC324241/>

- [26] CHENG, Wenlong, Shaojun DONG a Erkang WANG. *Synthesis and Self-Assembly of Cetyltrimethylammonium Bromide-Capped Gold Nanoparticles*. Langmuir [online]. 2003, 19(22), 9434-9439 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1021/la034818k. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la034818k>
- [27] KALBÁČOVÁ, Marie, Martina VERDÁNOVÁ, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ a Miloslav PEKAŘ. *Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, 460, 204-208 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.12.048. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775713009655>
- [28] *Sodium Dodecyl Sulfate*. PubChem [online]. [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <https://goo.gl/HtEoUH>.
- [29] SDS. G-Biosciences [online]. [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://www.gbiosciences.com/Protein-Research/SDS>
- [30] BÁRTA, JAN, VERONIKA BÁRTOVÁ a VLADISLAV ČURN. *ANALÝZA PROTEINŮ POMOCÍ AUTOMATICKÉ ČIPOVÉ ELEKTROFORÉZY EXPE-RION A POROVNÁNÍ S METODOU SDS-PAGE*. CHEMICKÉ LISTY [online]. 2010, (104), 33-40 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_33-40.pdf
- [31] *Sodium Dodecyl Sulfate*. The National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012967>
- [32] *Triton X-100*. G-Biosciences [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://www.gbiosciences.com/Protein-Research/Triton-X-100>
- [33] *Sigma Product Information Sheet: TRITON X-100*. In: *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z: <https://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf>
- [34] JOHNSON, Mary. *Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More*. Materials and Methods [online]. 2013, 3, - [cit. 2017-04-30]. DOI: 10.13070/mm.en.3.163. ISSN 2329-5139. Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>
- [35] NOVÁKOVÁ, KATEŘINA. *MODELOVÉ BIOLOGICKÉ MEMBRÁNY: JE-JICH CHARAKTERIZACE A VYUŽITÍ*. CHEMICKÉ LISTY [online]. 2015, 109, 166-175 [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_03_166-175.pdf
- [36] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. *Liposome: classification, preparation, and applications*. Nanoscale Research Letters [online]. 2013, 8(1), 102- [cit. 2017-04-17]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>

- [37] SCHWILLE, P., F.J. MEYER-ALMES a R. RIGLER. *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution*. Biophysical Journal [online]. 1997, 72(4), 1878-1886 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78833-7. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349597788337>
- [38] SIMEONOV, Peter, Stefan WERNER, Caroline HAUPT, Mikio TANABE a Kirsten BACIA. *Membrane protein reconstitution into liposomes guided by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Biophysical Chemistry [online]. 2013, 184, 37-43 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/j.bpc.2013.08.003. ISSN 03014622. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462213001385>
- [39] SCHAEFFEL, David, Roland Hinrich STAFF, Hans-Juergen BUTT, Katharina LANDFESTER, Daniel CRESPIY a Kaloian KOYNOV. *Fluorescence Correlation Spectroscopy Directly Monitors Coalescence During Nanoparticle Preparation*. Nano Letters [online]. 2012, 12(11), 6012-6017 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1021/nl303581q. ISSN 1530-6984. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl303581q>
- [40] KITAMURA, Akira, Yusaku NAKAYAMA, Ai SHIBASAKI, et al. *Interaction of RNA with a C-terminal fragment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP43 reduces cytotoxicity*. Scientific Reports [online]. 2016, 6(1), - [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1038/srep19230. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep19230>
- [41] WINZEN, Svenja, Max BERNHARDT, David SCHAEFFEL, Amelie KOCH, Michael KAPPL, Kaloian KOYNOV, Katharina LANDFESTER a Anja KROEGER. *Submicron hybrid vesicles consisting of polymer-lipid and polymer-cholesterol blends*. Soft Matter [online]. 2013, 9(25), 5883- [cit. 2017-05-08]. DOI: 10.1039/c3sm50733e. ISSN 1744-683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3sm50733e>
- [42] *Microtime 200*. PicoQuant [online]. [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes/microtime-200-time-resolved-confocal-fluorescence-microscope-with-unique-single-molecule-sensitivity#description>
- [43] KAPUSTA, Peter. *Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration* [online]. 2010 [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <https://goo.gl/d9erN0>
- [44] *SearchLight*. SemRock [online]. [cit. 2017-05-10]. Dostupné z: <https://searchlight.semrock.com/>

7. Zoznam použitých skratiek a symbolov

S_0	základná singletová hladina
S_1	excitovaná singletová hladina
T_1	excitovaná tripletová hladina
ϕ_f	kvantový výťažok
k_r	rýchlostná konštanta značiaca žiarivý prechod
k_{nr}	rýchlostná konštanta zahrňujúca všetky možné nežiarive prechody
$G(\tau)$	autokorelačná funkcia
$F(t)$	fluktuácia intenzity fluorescencie
δ	okamžitá odchylka signálu od jeho priemernej hodnoty
τ	časový interval
τ_1	krátke časové intervaly
τ_2	dlhé časové intervaly
τ_D	priemerná doba, ktorú strávi molekula v detekčnom objeme
$\langle C \rangle$	priemerná koncentrácia molekúl v detekčnom objeme
V_{eff}	efektívny objem
z_0	charakteristický rozmer detekčného objemu v smere optickej osy mikroskopu
r_0	charakteristický rozmer detekčného objemu v ohniskovej rovine
D	difúzny koeficient
T	teplota
η	viskozita
R_h	hydrodynamický polomer
k_B	Boltzmanova konštanta
$G_{ZC}(\tau)$	kros-korelačná funkcia pre dve fluorescenčné farbivá Z a C
$\langle F_c(t) \rangle$	priemerná hodnota intenzity fluorescencie červeného farbiva v čase
$\langle F_z(t) \rangle$	priemerná hodnota intenzity fluorescencie zeleného farbiva v čase

$\delta F_z(t + \tau)$	fluktuácia intenzity fluorescencie zeleného farbiva v čase
$\langle C_c \rangle$	koncentrácia molekúl označených červeným farbivom
$\langle C_z \rangle$	koncentrácia molekúl označených zeleným farbivom
$\langle C_{zc} \rangle$	koncentrácia molekúl označených červeným aj zeleným farbivom
V_{eff}^c	efektívny objem pre červené fluorescenčné farbivo
z_0^c	charakteristický rozmer detekčného objemu pre červené farbivo v smere optickej osy mikroskopu
r_0^c] charakteristický rozmer detekčného objemu pre červené farbivo v ohniskovej rovine
τ_D^c] priemerná doba, ktorú strávi molekula v detekčnom objeme pre červené farbivo
V_{eff}^z	efektívny objem pre zelené fluorescenčné farbivo
z_0^z	charakteristický rozmer detekčného objemu pre zelené farbivo v smere optickej osy mikroskopu
r_0^z] charakteristický rozmer detekčného objemu pre zelené farbivo v ohniskovej rovine
τ_D^z	priemerná doba, ktorú strávi molekula v detekčnom objeme pre zelené farbivo
V_{eff}^{zc}	efektívny objem vytváraný dvoma excitačnými paprskami
z_0^{zc}	charakteristický rozmer detekčného objemu vytváraného dvoma excitačnými paprskami v smere optickej osy mikroskopu
r_0^{zc}	charakteristický rozmer detekčného objemu vytváraného dvoma excitačnými paprskami v ohniskovej rovine.
τ_D^{zc}	priemerná doba, ktorú strávi molekula v detekčnom objeme vytváraného dvoma excitačnými paprskami
CMC	kritická micelárna koncentrácia
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
FCCS, DC-FCCS	dvojfarebná fluorescenčná kros-korelačná spektroskopia
Z	častice označené zelenou fluorescenčnou sondou
C	častice označené červenou fluorescenčnou sondou
ZC	častice označené červenou fluorescenčnou sondou
PAL	povrchovo aktívne látky